

Aus der Milchwirtschaftlichen Abteilung
des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik
Abteilungsleiter i. R.: Prof. Dr. A. Janoschek

Pin-Point-Kolonien bildende Organismen in Milch,
Ursachen, Klassifizierung sowie die Kinetik
ihrer Abtötung durch hohe Temperaturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Herbert Lieber
geb. in Zabeltitz/Sa.

Gießen 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153519_0042

Aus der Milchwirtschaftlichen Abteilung
des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik
Abteilungsleiter i. R.: Prof. Dr. A. Janoschek

Pin-Point-Kolonien bildende Organismen in Milch,
Ursachen, Klassifizierung sowie die Kinetik
ihrer Abtötung durch hohe Temperaturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Herbert Lieber
geb. in Zabeltitz/Sa.

Gießen 1967

D e k a n : Prof.Dr. Meimberg

1. Berichterstatter: Prof.Dr.A.Janoschek
2. Berichterstatter: Prof.Dr.Dr. Krüger

2.	Einleitung	1
3.	Legende	2
4.	Meinen Eltern gewidmet	3
5.	1. Kapitel	4
6.	2. Kapitel	5
7.	3. Kapitel	6
8.	4. Kapitel	7
9.	5. Kapitel	8
10.	6. Kapitel	9
11.	7. Kapitel	10
12.	8. Kapitel	11
13.	9. Kapitel	12
14.	10. Kapitel	13
15.	11. Kapitel	14
16.	12. Kapitel	15
17.	13. Kapitel	16
18.	14. Kapitel	17
19.	15. Kapitel	18
20.	16. Kapitel	19
21.	17. Kapitel	20
22.	18. Kapitel	21
23.	19. Kapitel	22
24.	20. Kapitel	23
25.	21. Kapitel	24
26.	22. Kapitel	25
27.	23. Kapitel	26
28.	24. Kapitel	27
29.	25. Kapitel	28
30.	26. Kapitel	29
31.	27. Kapitel	30
32.	28. Kapitel	31
33.	29. Kapitel	32
34.	30. Kapitel	33
35.	31. Kapitel	34
36.	32. Kapitel	35
37.	33. Kapitel	36
38.	34. Kapitel	37
39.	35. Kapitel	38
40.	36. Kapitel	39
41.	37. Kapitel	40
42.	38. Kapitel	41
43.	39. Kapitel	42
44.	40. Kapitel	43
45.	41. Kapitel	44
46.	42. Kapitel	45
47.	43. Kapitel	46
48.	44. Kapitel	47
49.	45. Kapitel	48
50.	46. Kapitel	49
51.	47. Kapitel	50
52.	48. Kapitel	51
53.	49. Kapitel	52
54.	50. Kapitel	53
55.	51. Kapitel	54
56.	52. Kapitel	55
57.	53. Kapitel	56
58.	54. Kapitel	57
59.	55. Kapitel	58
60.	56. Kapitel	59
61.	57. Kapitel	60
62.	58. Kapitel	61
63.	59. Kapitel	62
64.	60. Kapitel	63
65.	61. Kapitel	64
66.	62. Kapitel	65
67.	63. Kapitel	66
68.	64. Kapitel	67
69.	65. Kapitel	68
70.	66. Kapitel	69
71.	67. Kapitel	70
72.	68. Kapitel	71
73.	69. Kapitel	72
74.	70. Kapitel	73
75.	71. Kapitel	74
76.	72. Kapitel	75
77.	73. Kapitel	76
78.	74. Kapitel	77
79.	75. Kapitel	78
80.	76. Kapitel	79
81.	77. Kapitel	80
82.	78. Kapitel	81
83.	79. Kapitel	82
84.	80. Kapitel	83
85.	81. Kapitel	84
86.	82. Kapitel	85
87.	83. Kapitel	86
88.	84. Kapitel	87
89.	85. Kapitel	88
90.	86. Kapitel	89
91.	87. Kapitel	90
92.	88. Kapitel	91
93.	89. Kapitel	92
94.	90. Kapitel	93
95.	91. Kapitel	94
96.	92. Kapitel	95
97.	93. Kapitel	96
98.	94. Kapitel	97
99.	95. Kapitel	98
100.	96. Kapitel	99

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung	4
II.	Literaturübersicht	5
III.	Pin-Point-Kolonien (PPK) bildende Organismen in der Milchwirtschaft	7
	1. Ursachen für die Entstehung von PPK	7
	2. Vorbehandlung der Milch	11
	3. Isolierung und Reinzüchtung	15
	a) Streptokokken	16
	b) Mikrokokken	21
IV.	Die mathematische Auswertung des Abtötungs- effektes von PPK-bildenden Organismen durch Hitzeeinwirkung	29
	1. Einführung in die Reaktionskinetik	29
	2. Testorganismen, Milieu und Methodik	61
	3. Berechnung der Temperatur für das Kurzzeit- erhitzungsverfahren für einen bestimmten Abtötungserfolg bei einer einheitlichen Bakterienpopulation	69
	4. Ermittlung der Temperatur beim Übergang zu einem anderen Erhitzungsverfahren bei gleichbleibendem Abtötungseffekt.	73
V.	Diskussion	76
VI.	Zusammenfassung	82
	Literaturverzeichnis	84
	Lebenslauf	

I. Einleitung

Immer wieder hört man Klagen aus milchwirtschaftlichen Kreisen, daß der Pasteurisierungseffekt bei den gebräuchlichen Erhitzungsverfahren, insbesondere der Kurzzeiterhitzung, nicht befriedigend sei. Diese, die Pasteurisierung überlebenden Keime sind vielfach die sogen. "Pin-Point-Kolonien"-bildenden Organismen, denen man eine hohe Thermoresistenz zuschreibt.

Der Ausdruck "Pin-Point-Kolonien" wurde in den Vereinigten Staaten von Amerika geprägt und bedeutet, daß die Organismen Kolonien in der Größe eines Nadelstichpunktes, oft in großer Zahl bei Milchuntersuchungen auf Agar-Nährböden bilden und dadurch die Auswertung bei Keimzahlbestimmungen mit einem Unsicherheitsfaktor belasten.

Über die Herkunft und die Ursachen dieser "Pin-Point-Kolonien" wurden bisher die unterschiedlichsten Meinungen vertreten, und die Diskussion darüber ist immer noch im Gange. So erscheint es sinnvoll, im Rahmen dieser Arbeit systematisch festzustellen, um welche Organismenarten es sich bei den "Pin-Point-Kolonien" handelt, unter welchen Einflüssen sie entstehen und wie sie auszuschalten sind.

II. Literaturübersicht

Über die an den PPK beteiligten Organismenarten sind bisher die widersprechendsten Angaben gemacht worden.

Schon AYERS und MUDGE (1920) meinten, daß die PPK von Milchsäurebakterien stammen, denen die Nährbodenzusammensetzung für ihr Wachstum unzureichend ist. Man änderte diese Meinung und glaubte, nur thermophile und thermotolerante Bakterien seien die Ursache. Andere führten die Entstehung von PPK auf den Einfluß äußerer Umstände, wie pH-Wert, Nährbodenbestandteile, zu dichte Plattenbesiedlung, Jahreszeit usw. zurück.

AYERS und JOHNSON (1924), sowie CHARLTON (1932) isolierten und beschrieben den schon legendären *Lactobacillus thermophilus*, der auch im bakteriologischen Handbuch von BERGEY (1957) verzeichnet ist, und hielten ihn für die PPK verantwortlich.

Alle Bemühungen, diesen *Lactobacillus thermophilus* aus international bekannten Institutssammlungen zu erhalten, scheiterten, obgleich es, wenn er der alleinige Urheber der PPK wäre, ihn zu isolieren, nicht schwer sein dürfte. Aber er scheint gar nicht zu existieren.

Hierzu einige Ausführungen von SHARPE (1962).

Die vom Verfasser geprüften, aus Kultursammlungen stammenden, als "*Lactobacillus thermophilus*" bezeichneten Stämme waren katalasepositiv. Wenn sie auf einem Sporen-induzierenden Medium nach WILLIAMS u.a. (1957) anwuchsen, bildeten sie Sporen. Es ist manchmal schwierig, zwischen einem aeroben Sporenbildner und einem thermophilen *Lactobacillus* zu unterscheiden. Beide können als glatte Kolonien wachsen, haben ein ähnliches mikroskopisches Aussehen, wachsen gut im typischen *Lactobacillen*-Medium ohne Bildung von Häutchen oder Sporen und produzieren Säure in Milch. Aber die Anwesenheit von Katalase und die Bildung von Sporen auf einem Sporen induzierenden Medium klären den Unterschied zwischen ihnen. Bei der Identifizierung durch AYERS u. JOHNSON (1924) wurde kein Katalasetest ausgeführt. Es könnte vielleicht *Bacillus coagulans* gewesen sein. ROBERTSON (1927) deutete an, daß *Lactobacillus thermophilus* in Wirklichkeit *Mikrobakterium lacticum* sei, aber das Wachstumsoptimum

des letzteren liegt um 30°C. Der oben beschriebene Befund legt nahe, daß es ein aerober Sporenbildner ist, und er sollte nicht länger für einen *Lactobacillus* gehalten werden.

SWENARTON (1925) gab ausschließlich Milchsäurestreptokokken als Ursache der PPK an, JOHNSON und EXWORTHY (1925) thermoresistente Streptokokken, FAY (1927) thermoresistente *Streptococcus lactis* ähnliche Streptokokken, ROBERTSON (1927) *Microbacterium lacticum* und *Str. thermophilus*, DIEHM (1929) ebenfalls hitzeresistente *Streptococcus lactis*-Keime, DEMETER (1929) bezeichnete die PPK als "Kümmerkolonien" von Milchsäurebakterien, bedingt durch das Fehlen von Zucker im Nährboden.

Dagegen sind BOYSEN und GODBERSEN (1955) der Meinung, daß die die Pasteurisierung überlebenden PPK bildenden Organismen auf einem zuckerfreien Nährboden gar nicht erst anwachsen. Sie propagieren die Verwendung eines solchen Nährbodens, um somit die angeblich die Haltbarkeit der Trinkmilch nicht beeinflussenden Kleinkolonien bildenden Organismen auszuschalten und dadurch eine "gerechtere" Beurteilungsmöglichkeit zu haben.

Aus Untersuchungen von KELLERMANN (1964), ebenso aus eigenen, geht hervor, daß gewisse Milchsäurebakterien trotz Abwesenheit vergärbare Kohlenhydrate Kolonien bilden.

" Das Auftreten der bei der Auswertung der Befunde so störenden Pin-Point-Kolonien wurde durch Bouillonagar nicht verhindert. Offensichtlich sind manche Streptokokken imstande, sich andere Kohlenstoffquellen zu erschließen, wenn Zucker fehlt".

STOCKER (1958) fand bei Abtötungsversuchen mit hitzeresistenten Milchsäurestreptokokken, isoliert aus pasteurisierter Trinkmilch vieler Molkereien, unter Verwendung von Chinablau-Milchzucker-Agar-Nährboden, folgende Zusammensetzung Kleinkolonien-bildender Organismen:

80 % *Streptococcus faecium*, 12 % *Streptococcus glycerinaceus*, der Rest von 8 % bestand vorwiegend aus dem *Streptococcus thermophilus*. Ausserdem waren noch andere Kokken in geringem Ausmaß vorhanden.

Aus Mitteilungen ist zu entnehmen, daß bei vielen Mikrobiologen die Meinung besteht, Hitzeeinwirkung löse bei Pin-Point-Kolonien bildenden Keimen Mutationen aus. Diese Mutationen sollen bewirken, daß die hitzegeschädigten Keime in der Lage sind, nur noch kleine Kolonien (PPK) zu bilden. Diese Vorstellung ist aber biologisch nicht vertretbar, da Hitze kein mutagenauslösender Faktor ist.

Die in der Literatur gemachten Angaben beruhen zum Teil mehr oder weniger auf Vermutungen. In dieser Arbeit soll ein weiterer Beitrag zur Klärung dieses Problems geleistet werden.

III. Pin-Point-Kolonien (PPK) bildende Organismen in der Milchwirtschaft

1. Ursachen für die Entstehung von PPK

In Milch, die mit Keimen von Reinkulturen verschiedener Milchsäurebakterien aus der Institutssammlung und aus Milchproben beimpft worden war, wurde vor und nach Pasteurisierung die Zahl der Keime mit der KOCH'schen Plattenmethode ermittelt und der Einfluß der Nährbodenzusammensetzung, der Bebrütungsdauer und eine eventuelle mutative Beeinflussung durch Hitzeeinwirkung auf die Größe ihrer Kolonien geprüft.

a). Nährbodenzusammensetzung:

Verwendet man zur Keimzählung Nährböden mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen, erhält man recht unterschiedliche Ergebnisse. Gut geeignet für diesen Test ist der absolut zuckerbedürftige *Str. thermophilus*. Wird ein Bouillon-Nährboden entsprechend den Qualitätsbestimmungen der DLG- Wettbewerbe, der Markenmilchverordnung, und wie er z.T. auch bei der Durchführung der amtlichen Trinkmilchprüfungen verwendet wird, benutzt, ist trotzdem ein Wachstum von *Str. thermophilus* bei entsprechend langer Bebrütung in geringem Maße möglich - es kommt zur Bildung von PPK. Das läßt den Schluß zu, daß in diesem Nährboden Spuren von Zucker, der vom Fleischpepton stammt, enthalten sind. Kein Wachstum findet statt, wenn der in der Bouillon enthaltene Zucker vor dem Agar-Zusatz durch Beimpfen mit Colibakterien, die beim Sterilisieren wieder abgetötet werden, abgebaut wird.

Daß schon ganz geringe Mengen Zucker das Wachstum ermöglichen, geht auch eindeutig aus Untersuchungen des Milchwirtschaftlichen Institutes der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt der Technischen Hochschule München Weihenstephan (Jahresbericht 1962) hervor.

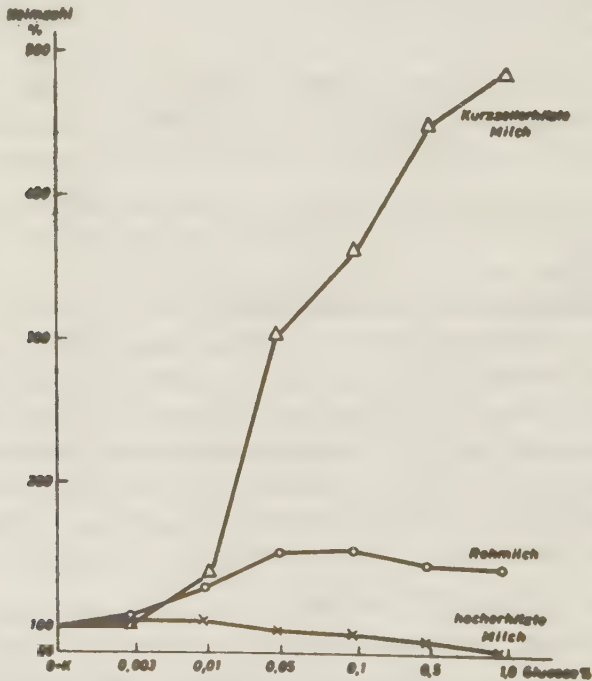


Abb.1: Keimzahl in Prozent der zuckerfreien Kontrolle

Die Abbildung 1 zeigt den Einfluß steigender Zuckerkonzentrationen auf die Keimzählung bei Rohmilch, kurzzeiterhitzter und hoherhitzter Milch. Bei der kurzzeiterhitzten Milch tritt eine Vervielfachung (bis zu 5 fach) der Keimzahl ein. Dies beruht darauf, daß in diesem Falle in der kurzzeiterhitzten Milch der Str. thermophilus bis über 90 % der Gesamtkeimzahl ausmacht. Der in der Rohmilch dominierende Str.lactis ist nicht derart zuckerbedürftig und wächst auch auf zuckerfreien Nährböden zu kleinen, aber sichtbaren Kolonien. Die kritische Konzentration von Zucker liegt somit, wenn kein Einfluß gegenüber der

zuckerfreien Kontrolle verursacht werden soll, bei 0,003 %.

Diese kritische Konzentration wird aber schon bei einer Milchverdünnung von 1 : 100, verteilt in 10 ml Nährboden einer Kulturschale, überschritten. Legt man einen durchschnittlichen Laktosegehalt der Milch von 4,6 % zugrunde, so sind in 1/100 ml Milch 0,00046 g Laktose enthalten. Der kritischen Konzentration entsprechen, bezogen auf 10 ml Nährboden, 0,0003 g.

Welchem Nährboden, dem zuckerfreien Bouillon-Agar oder einem in seiner Zusammensetzung optimalen, ist der Vorzug zu geben? Bei der Keimzahlbestimmung von pasteurisierten Milchproben auf Bouillon-Agar konnte immer wieder beobachtet werden, daß auf den Platten der Verdünnungen 1 : 100 und 1 : 1000 die Kolonienanzahl nicht, wie erwartet, um das Zehnfache, sondern um ein Vielfaches mehr abnahm. Diese springenden Werte sind auf den durch die Verdünnung abnehmenden Laktosegehalt, der durch die Milchproben mit in die Kulturschale gelangt, zurückzuführen. Bei der Verdünnung 1 : 100 reicht die Zuckermenge für das Wachstum der zuckerbedürftigen Organismen noch aus, bei der Verdünnung 1 : 1000 dagegen nicht mehr. Das bedeutet aber eine Benachteiligung der Milchproben guter Qualität bis 30 000 Keime/ml gegenüber Milchen mit höherer Keimzahl, da bei letzteren bei der Keimzahlbestimmung Platten mit hohen Verdünnungen zur Auswertung gelangen. Es erfolgt somit eine unterschiedliche Beurteilung selbst bei Verwendung des gleichen Nährbodens. Bei Benutzung eines zuckerhaltigen Nährbodens tritt dieser Fehler nicht auf, ganz abgesehen von der annähernden Wiedergabe des wahren Keimgehaltes. Man könnte auch einen in seiner Zusammensetzung noch ungünstigeren Nährboden als den Bouillon-Agar verwenden, um eine gute Milchqualität vorzutäuschen, aber dann würde jegliche Qualitätskontrolle unglaublich werden.

In den USA ist bei amtlichen Milchkontrollen (DEMETER 1952) seit 1939 ein Trypton-Glukose-Extrakt-Magermilch-Agar folgender Zusammensetzung vorgeschrieben:

Trypton	5 g	Frische Magermilch	10 ml
Glukose	1 g	Agar	15 g
Fleischextrakt	3 g	Dest. Wasser	1000 ml

Die Magermilchzugabe fällt weg, wenn Milch ohne Verdünnung oder zu einem Zehntel verdünnt verarbeitet wird.

b). Bebrütungsdauer

Die nach der Pasteurisation am Leben bleibenden Restkeime stellen unterschiedliche Ansprüche an ihre optimale Wachstumstemperatur. Um allen Organismenarten Gelegenheit einer Vermehrung zu geben, einigte man sich auf eine Bebrütungstemperatur von 30°C für die Dauer von 48 Stunden. Da aber gerade ein hoher Prozentsatz der hitzeresistenten Keime (*Str. thermophilus*, *Str. bovis*) zu den thermophilen Organismen gehören mit einem Temperaturoptimum von $40 - 45^{\circ}\text{C}$, sind sie bei einer Bebrütung von 30°C in ihrer Vermehrung gehemmt, und die ohnehin für Milchsäurebakterien typisch kleinen Kolonien können innerhalb 48 Stunden nicht ihre optimale Größe erreichen - es kommt zur Bildung von PPK.

c) Mutative Beeinflussung durch Hitzeeinwirkung

Kann sich eine Hitzeeinwirkung auf Keime durch Entstehung kleinerer Kolonien bemerkbar machen, wie verschiedentlich geäußert wird? Vielleicht eine Schlußfolgerung aus der Beobachtung, daß PPK hauptsächlich bei der Keimzählung von pasteurisierter Milch auftreten.

Dem sei entgegnet, daß die Pasteurisierung eine Auslese der hitzeresistenten, von Natur aus kleine Kolonien bildenden Organismen darstellt. Sie sind in der Rohmilch ebenso anzutreffen, nur ist hier ihr Anteil neben den anderen weniger hitzestabilen Keimen, viel geringer, da bei der Keimzählung in Rohmilch Platten mit wesentlich höheren Verdünnungen zur Auswertung gelangen. Wenn Hitzeeinwirkung die Bildung kleinerer Kolonien bedingt, dann nur infolge einer Mutation, denn bis zum Auswachsen der Kolonien ist eine Vielzahl von Generationen entstanden. Aber Hitze ist nicht als mutagener Faktor bekannt. Der Zeitraum einer verspäteten Zellteilung durch Hitzeschädigung bis zur Regenerierung der Zelle dürfte, da das Alter einer Zelle ohnehin sehr begrenzt ist, so unbedeutend und damit nicht optisch an der Größe der Kolonie wahrnehmbar sein.

Aber dennoch konnte bei einer Anzahl aus Milch isolierter Kulturen diese Erscheinung beobachtet werden. Platten gleicher Besiedlungsdichte einer frisch erhitzten Milch und derselben unerhitzten Kultur wurden bezüglich der Koloniengröße miteinander verglichen. Eine größere Anzahl gekennzeichnete Kolonien wurden unter dem Mikroskop mit einem Schraubenmikrometerokular nach 48 stündiger Bebrütung gemessen. Es ergab sich ein durchschnittlicher Größenunterschied der Kolonien von erhitzter zu unerhitzter Kultur wie 1 : 1,4. Der auch visuell gut sichtbare Größenunterschied war nach weiterer Bebrütung bei der zweiten Messung ausgeglichen. Bei diesen Kulturen handelt es sich um Organismen, die zur Bildung größerer Zellverbände neigen. Im unerhitzten Zustand der Kultur entsteht im Nährboden die einzelne Kolonie aus einem Zellverband, während bei der erhitzten Kultur die Koloniebildung von einer kleinen Anzahl überlebender und vereinzelter Zellen eines Verbandes, im Extremfall von einer Zelle, ausgeht. Da ausserdem diese Organismengruppe - sie nimmt den höchsten Anteil der überlebenden Keime in erhitzter Milch ein (s.S. 28) - auch bei Optimaltemperatur nur langsam wächst, ist bei Auswertung der Platten nach 48 Stunden die optimale Koloniengröße der erhitzten Kultur gegenüber der unerhitzten noch nicht erreicht. Bei weiterer Bebrütung findet ein Ausgleich statt.

Weitere Faktoren, wie Besiedlungsdichte der Kulturplatten, pH-Wert und Schichthöhe des Nährbodens, haben Einfluß auf die Größe der Kolonien.

2. Vorbehandlung der Milch

Von der Giessener Molkerei wurden aus der Anlieferungsmilch verschiedener, über das ganze Einzugsgebiet verteilter Lieferanten 300 Rohmilchproben in sterilen Flaschen im Zeitraum Juni bis November entnommen. Im Labor wurden 5 ml Milch dieser Proben in dünnwandigen Reagenzgläsern in einem Ultrathermostaten 30 Minuten lang bei einer Temperatur von 62°C erhitzt. Von der erhitzten und der Rohmilch wurden jeweils mit Bouillon- und Laktose-Agar Kulturplatten angelegt; zwei verschiedene Nährböden deshalb,

um ihren Einfluß auf die Größe der gewachsenen Kolonien vergleichen zu können. Bei dem Bouillon-Agar wurde nach viertägiger Bebrütungszeit eine Keimzählung durchgeführt, um den Abtötungseffekt zu ermitteln. 4 Tage Bebrütung bei 30°C, damit alle Kolonien Gelegenheit hatten, eine optimale Größe zu erreichen, und Bouillon-Agar, weil bei ihm eine bessere Trennung in PPK und andere Kolonien möglich ist.

Wie oben erwähnt, ist auch *Streptococcus thermophilus* fähig, auf Bouillon-Agar Kolonien zu bilden, wenn auch nicht immer makroskopisch sichtbare. Aus diesem Grunde wurden alle auszählenden Platten zusätzlich mit einem Stereoskop ausgewertet.

Tabelle 1 zeigt 20 Milchproben, aufgegliedert in:

Gesamtkeimzahl und PPK der Rohmilch und der erhitzten Milch sowie den Abtötungseffekt der Gesamtkeime und der PPK in Prozent.

Tabelle 1

Proben	Rohmilch		erhitzte Milch		Abtötungseffekt in %	
	Gesamtkelmzahl	PPK	Gesamtkelmzahl	PPK	Gesamtkelme	PPK
1	181.000.000	168.000.000	6.500.000	6.280.000	96,4	96,27
2	37.800.000	I x II 19.300.000 1.200.000	I x II 233.000	- 233.000	I x II 99,38	I x II 100 00) 80,60)
3	30.300.000	30.300.000	37.500	37.500	99,80	99,80
4	24.900.000	10.400.000	9.200	9.200	99,97	99,91
5	19.300.000	8.400.000	546.000	546.000	97,17	93,50
6	6.000.000	4.500.000	100	-	99,99	-
7	5.350.000	2.000.000	280	-	99,99	-
8	3.340.000	960.000	3.170	3.170	99,91	99,67
9	2.740.000	500.000	70.000	70.000	97,44	86,00
10	2.620.000	2.020.000	2.120.000	1.842.000	19,09	8,80
11	1.780.000	660.000	2.410	440	99,86	99,93
12	1.630.000	1.340.000	1.128.000	1.128.000	30,60	15,80
13	1.530.000	600.000	126.000	126.000	91,80	79,00
14	1.315.000	580.000	432.000	432.000	67,40	25,50
15	890.000	90.000	2.210	2.210	97,52	97,54
16	720.000	40.000	30.600	29.200	95,75	27,00
17	429.000	42.000	32.300	32.300	92,50	23,10
18	175.000	21.000	9.700	9.700	94,45	53,80
19	166.000	6.000	2.050	600	98,70	90,00
20	150.000	10.000	4.500	3.000	97,00	70,00

I und II^x Bei den PPK dieser Probe waren zwei verschiedene Kolonienformen feststellbar.

Tabelle 2: Milchproben, die keine PPK enthalten.

Proben	Keimzahl Rohmilch	Keimzahl erhitzte Milch	Abtötungs- effekt in %
1	4.430.000	77.000	98,26
2	4.100.000	2.400	99,94
3	3.400.000	2.470	99,93
4	2.840.000	11.650	99,59
5	2.000.000	2.800	99,86
6	1.875.000	7.500	99,60
7	1.745.000	90	99,99
8	1.250.000	7.000	99,47
9	1.275.000	20	99,99
10	1.000.000	1.790	99,82
11	1.000.000	490	99,95
12	890.000	1.600	99,82
13	715.000	4.100	99,43
14	450.000	1.320	99,71
15	280.000	1.500	99,43
16	206.000	30	99,99
17	178.000	960	99,47
18	146.500	4.000	97,27
19	97.000	-	100,00
20	59.000	240	99,60

Tabelle 1 zeigt, daß PPK-bildende Organismen in größerem Ausmaß vorwiegend in Proben mit hoher Gesamtkeimzahl vorkommen.

Sie stellen auch in vielen erhitzten Proben die gesamten Restkeime dar und erniedrigen den Abtötungserfolg, der bei Abwesenheit von PPK meistens über 99 % liegt, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist.

In den Fällen, wo die PPK vollständig abgetötet wurden, handelt es sich um nicht hitzestabile Organismen, die in den Rohmilchproben miterfaßt wurden.

Die Fähigkeit, PPK zu bilden, beschränkt sich nicht auf hitzeresistente Organismen.

3. Isolierung und Reinzüchtung

Von denjenigen Proben, die PPK in größerer Anzahl in der Rohmilch und in der erhitzten Milch enthielten (34 %), wurden solche Kolonien in eine für das Wachstum der Milchsäurebakterien günstige Nährbouillon nach dem Rezept NAGUIB (1961) überimpft, wobei darauf zu achten ist, daß die Keime aus dem ausgestochenen Agarstückchen durch gründliches Zerdrücken desselben in Freiheit gelangen.

Rezept der Nährbouillon:

Fleischextrakt	0,3 %
Hefeextrakt	0,3 %
Pepton	0,5 %
Glukose	0,5 %
Laktose	0,5 %
pH	7,2

Bei 30°C wurde so lange bebrütet, bis eine Trübung ausreichendes Wachstum anzeigte. Von der Bouillon wurde eine Öse auf die Agaroberfläche des gleichen Nährmediums ausgestrichen. Von den sich entwickelnden Kolonien wurde eine einzelliegende wiederum in Nährbouillon überimpft. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis das Vorliegen einer Reinkultur zu erwarten war.

Von der Bouillon wurden die Kulturen auf Schrägagar desselben Mediums überimpft und so lange bei 30°C bebrütet, bis gutes Wachstum sichtbar wurde (gewöhnlich 24 bis 48 Stunden).

Diese Schrägagarkulturen wurden für die morphologischen Studien benutzt, einschließlich einer Prüfung auf Vorhandensein von Katalase verwendet.

Die gewonnenen Reinkulturen konnten somit in die Gattungen Streptococcus und Micrococcus eingegliedert werden. Die einzelnen Arten dieser Gattungen wurden klassifiziert.

a. Streptokokken

Nach BERGEY (1957) sind die Zellen rund oder eiförmig, selten länglich; vorkommend in Paaren oder kurzen und langen Ketten. Nicht beweglich, ausgenommen einige wenige Arten der Enterokokken-Gruppe. Grampositiv. Keine Pigmentbildung. Für ein befriedigendes Wachstum in einem künstlichen Medium ist ein fermentierbares Kohlenhydrat oder ein höherer Alkohol notwendig. Beim Wachstum in Bouillon ist die Kultur in ihren Merkmalen veränderlich. Unterschiede können sich zeigen in granuliertem Wachstum, das zu schnellem Absetzen neigt, eine klare Überlagerung hinterlassend oder in einer gleichmäßigen Trübung mit geringer Tendenz zum Absetzen.

Ein Häutchen wird niemals gebildet. Das Wachstum auf der Agaroberfläche ist gewöhnlich spärlich. Die Kolonien sind klein. Die Koloniebeschaffenheit innerhalb einer Art kann sich erstrecken von rauh zu glatt, matt zu glänzend und schleimig. Die Fermentation von Kohlenhydraten ist homofermentativ mit rechtsdrehender Milchsäure als dominierendes Endprodukt. CO_2 wird in sehr kleinen Mengen produziert, aber nicht aus jedem Zucker.

Nitrate werden nicht zu Nitriten reduziert. Die Keime sind sauerstoffakultativ und katalasenegativ. Zellfarbstoffe fehlen. Die Zellen sind nicht löslich in 10%iger Galle. Proteolytische Stämme sind nur in der Enterokokken-Gruppe zu finden.

Alle Streptokokken sind sehr wählerisch in Hinsicht ihrer Nahrungsbedürfnisse. Sie brauchen für ihr Wachstum eine Anzahl von B-Vitaminen und Aminosäuren.

Sie kommen regelmäßig vor im Mund und im Intestinaltrakt des Menschen und der Tiere, in Milch und anderen Nahrungsprodukten und vor allem auf Pflanzen.

Anhand der aufgezählten Merkmale ist es aber nicht möglich, zwischen Gruppen bzw. Arten zu unterscheiden. Wenn die mikroskopische Untersuchung und der negative Katalasetest die Zugehörigkeit zur Gattung Streptococcus erkennen ließ, konnte die Hauptgruppe wie folgt ermittelt werden.

Zum Testen eigneten sich folgende, von ABD-EL-MALEK und GIBSON (1948) übernommene Verfahren:

1). Bildung von Ammoniak aus Arginin:

Rezept der Nährlösung:

1 % Pepton	0,1% Glukose
0,5 % Hefeextrakt	pH = 7
0,3 % L-Arginin	

Die in Röhrchen abgefüllte Nährlösung wird mit 24 - 48 Stunden alter Schrägagar-Kultur beimpft und 5 Tage bei 30° C bebrütet.

Der Ammoniak-Nachweis erfolgt mit Nessler's Reagens. Spuren von Ammoniak färben die Lösung durch Bildung von $\text{Hg} [\text{Hg J}_3 (\text{NH}_2)]$ orangebraun, größere NH_3 -Mengen ergeben eine tiefbraune Fällung.

2). Wachstum bei 45°C

Dieser Test wird in Lackmusmilch im Wasserbad durchgeführt. Zeigen die Organismen in reiner Milch eine geringe Aktivität, kann dieser 0,25 % Glukose und 0,25 % Hefeextrakt zugesetzt werden.

3). Wachstum bei 10°C

Röhrchen mit Lackmusmilch (0,25 % Glukose und 0,25 % Hefeextrakt) werden beimpft und bei 10°C aufbewahrt. Wenn innerhalb 2-3 Wochen keine Veränderung eintritt, ist das Ergebnis als negativ zu werten.

4). Überleben beim Erhitzen auf 63°C für 30 Minuten

Die Hitze-resistenz ist ein brauchbares Unterscheidungsmerkmal zwischen den Streptokokken, vorausgesetzt, daß eine gleichbleibende Technik für ihren Nachweis angewandt wird. 5 ml sterile Magermilch in einem Röhrchen werden mit 2 ml einer frischen Laktosebouillonkultur beimpft. Vorsicht ist beim Beimpfen anzuwenden, damit die Wandungen der Röhrchen nicht verunreinigt werden. Die Röhrchen werden in ein Wasserbad von 63°C - mit der Milchoberfläche gut unter der Wasseroberfläche gebracht und nachdem die Milch die Temperatur von 63°C erreicht hat noch 30 Minuten gehalten. Die Röhrchen werden abgekühlt und 0,2 ml der Milch wird zusammen mit Glukose-Agar in Petrischalen gegossen. Die Platten werden bei 30°C bebrütet und nach 3-4 Tagen auf Wachstum überprüft.

Eine Differenzierungstemperatur von 63°C wurde deshalb ausgewählt, weil diese bei der Pasteurisation der Milch angewendet wird und ein besserer Zusammenhang mit dem leicht bestimmbar und diagnostisch wichtigen Merkmal, bei 45°C zu wachsen, besteht, als z.B. bei der häufig angewandten Temperatur von 60°C .

5). Aktion in Lackmusmilch

Das Hauptkennzeichen dieses Tests sollte die Reduktion von Lackmus sein. Diese Reaktion ist für Arten, die lange Perioden künstlich kultiviert wurden, nicht sicher. Nützlich ist sie für die Bestimmung von frisch isolierten Stämmen von *Str. lactis* und *Str. cremoris*. Die Reduktion beginnt bei frisch isolierten Stämmen dieser beiden Arten, ehe der Indikator nach rosa umschlägt, und ist beendet vor Gerinnung der Milch.

6). Bildung von CO_2 aus Glukose

Dieser Test ist geeignet zur Erkennung von heterofermentativen Streptokokken.

Rezept des Nährbodens:

1000 ml Magermilch

4 g Agar

50 g Glukose

25 ml Lackmustinktur

Den Agar im Dampftopf in der Milch auflösen, Glukose und Lackmustinktur hinzufügen, 5 ml-Portionen in Reagensgläser abfüllen und fraktioniert sterilisieren. Vor Beimpfen der Röhrchen mit 0,2 ml Bouillonkultur den Nährboden im Dampf verflüssigen und auf 45°C temperieren. Nach Erstarren des Mediums etwa 1 cm hoch mit Wasser-Agar überschichten; 5 Tage bei 30°C bebrüten, die Röhrchen nach 24 Stunden umstülpen, um ein allmähliches Entweichen des gebildeten Gases zu verhindern. Bei CO_2 -Bildung Zerreißen der Agarsäule.

Tabelle 3 zeigt, wie die Organismen mittels der beschriebenen Tests in Hauptgruppen gegliedert werden.

Tabelle 3: Gruppierung der Streptokokken

	Mastitis- Gruppe	Str.bovis Str. thermo- philus	Str.lactis Str.cremo- ris	Str. Hetero- faeca-fermen- lis tative	
Ammoniak aus Arginin:	+	-	+(lactis) -(cremo- ris)	+	-
Wachstum bei 45°C	-	+	-	+	-
10°C	-	-	+	+	+
Überleben b. 63°C 30 min.	-	+	-	+	±
kräftige Reduk- tion v.Lackmus	-	-	+	±	-
CO ₂ aus Gluko- se	-	-	-	-	+

Diejenigen Kulturen, die einer der Hauptgruppen zugewiesen werden konnten, wurden durch Fermentationsprüfungen anhand des Systems von ORLA-JENSEN (1919), siehe Tabelle 4 differenziert.

Als Grundmedium für die Fermentationsprüfungen wurde Fleisch-extraktbouillon folgender Zusammensetzung verwendet (von SEELEMANN 1954 modifiziert):

Fleischextrakt	3 %
Pepton aus Casein	10 %
NaCl	3 %
Natriumphosphat sekundär	2 %
pH = 7,4	

Eventuell vorhandene Spuren von Zucker aus dem Fleischextrakt wurden auf biologischem Wege durch Angären mit Coli-Bakterien beseitigt.

Der Zusatz der Testsubstanzen erfolgte gleichmäßig in Mengen von 1 %. Die in Reagenzröhrchen abgefüllte Bouillon wurde im Dampftopf fraktioniert sterilisiert und mit 24 Stunden alter Schrägagar-Kultur beimpft. Die Prüfung erfolgte nach der Bebrütung mit Bromkresolpurpur (HALLMANN 1961), dessen Farbumschlagsbereich bei pH 5,2 - 6,8 liegt.

b. Mikrokokken

BERGEY (1957) führt die Mikrokokken als Gattung *Micrococcus* in der Familie *Micrococcaceae*. Der Gattungsname *Micrococcus* ist im Sinne der botanischen Nomenklatur der einzig richtige. Während ORLA-JENSEN (1919) alle zur Zuckerzersetzung fähigen Mikrokokken und Sarcinen in der Gattung "*Tetracoccus*" zusammenfaßt und zu den Milchsäurebakterien zählt.

In der Beschreibung nach BERGEY (1957) bilden die Mikrokokken unregelmäßige Massen, niemals Pakete. Sie werden als grampositiv erachtet, obgleich einige Arten die Fähigkeit, den Gramfarbstoff zurückzubehalten, so schnell verlieren, daß sie häufig als gramnegativ erscheinen. Manche Arten sind beweglich oder zeigen bewegliche Varietäten. Das Wachstum auf Agar ist gewöhnlich gut. Einige Arten bilden kein Pigment, andere gelbes, oranges oder rotes. Soweit wie bekannt, sind sie katalasepositiv. In Glukose-Bouillon findet geringe Säurebildung statt, Laktosebouillon bleibt gewöhnlich neutral. Gelatine wird häufig verflüssigt, aber immer sehr langsam. Sie leben saprophytisch, fakultativ parasitisch oder parasitisch. Sie sind niemals echt pathogen.

Micrococcus luteus ist die typische Art der Gattung *Micrococcus*. Zur Familie *Micrococceae* gehören auch die pathogenen, coagulase-positiven *Staphylokokken*, die in der Gattung *Staphylococcus* mit der typischen Art *Staphylococcus aureus* geführt werden. Sie sind weniger hitzeresistent als die *Mikrokokken*.

Für die Klassifizierung der *Mikrokokken* wurde die Arbeit "Die *Staphylokokken* und *Mikrokokken* in Milch" von ABD-EL-MALEK und GIBSON (1948) zugrunde gelegt. Der Zweck der genannten Arbeit war es, Klarheit über die Haupttypen von *Staphylokokken* und *Mikrokokken*, die in Milch vorkommen zu erlangen, um mit der irrigen Annahme aufzuräumen, daß das Euter eine wichtige Quelle von hitzeresistenten *Mikrokokken* der Milch sei. Diese Annahme entstand daraus, daß man den im Kuheuter vorkommenden *Mikrokokken* die gleichen Namen gegeben hat wie den in pasteurisierter Milch gefundenen hitzebeständigen Typen. Für vergleichende Untersuchungen wurden Kulturen aus dem Kuheuter, aus Rohmilch, aus pasteurisierter Milch und aus pasteurisiertem Spülwasser milchwirtschaftlicher Geräte isoliert.

Beobachtungen von MALEK und GIBSON (1948) haben ergeben, daß gewisse Merkmale, wie z.B. die Fähigkeit der Gelatineverflüssigung und der Nitratreduktion, die wenig Beziehung zu anderen Eigenschaften der Organismen haben, geringen taxonomischen Nutzen besitzen. Als diese Tatsache bekannt wurde, schien der *Staphylococcus-Micrococcus*-Zusammenhang weniger ein Mosaikkomplex zu sein. Das Muster konnte zu einer linearen Reihe vereinfacht werden, in der das eine Extrem der pathogene *Staphylokokkus* und das andere der wärmestabile *Saprophyt* ist. Obwohl die Reihe im wesentlichen kontinuierlich zu sein scheint, konnten 3 Hauptgruppen erkannt werden. Einige der Unterschiede zwischen den 3 Gruppen und den Untergruppen sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5: Differenzierungsmerkmale zwischen Staphylokokken und Mikrokokken in Milch:

	I				II		III	
	Staphylokokken-Gruppe				Mittelgruppe		Milch-Mikrokokken	
	A	B	C	D	A	B	A	B
Säure von Glukose	+	+	+	+	-	+	+	+
NH ₃ von Arginin	+	+	+	-	-	-	-	-
Acetoin-Bildung	+	+	(+)	(+)	-	-	-	-
Coagulase-Produkt.	+	-	-	-	-	-	-	-
Säure von Mannitol	+	-	V	V	-	-	-	-
Überleben in Milch bei 60°C f. 30 min. ^x	-	-	-	-	V	+	+	+
Säure v. Glycerin	V	V	V	V	-	-	-	+
Pigment auf Agar	gelb, orange, rehfärbig oder kein	grünlich-gelb oder kein	grünlich- matt grün- lich gelb o. kein	?	Milchwirtschaftl. Gerät			

Grundsätzlicher

Ursprung

V = variabel

x = Arten, die eine geringe Überlebensrate zeigen, augenscheinlich durch die gelegentliche Bildung einer kleinen Anzahl von Kolonien (<10), wenn die erhitzte Suspension in Platten gegossen wird, werden als abgetötet erachtet (-).

Gruppe I besteht aus Organismen, die verhältnismäßig empfindlich gegen Hitze sind und Glukose und andere Zucker fermentieren. Sie leben vorwiegend parasitisch. Die Argininhydrolyse und die Bildung von Acetoin bei Organismen dieser Gruppe haben bisher wenig Interesse erweckt, obwohl beide wertvolle Unterscheidungskriterien sind.

Gruppe II umfaßt die obligat aeroben Organismen, die keinen Zucker fermentieren. Ihre Herkunft konnte nicht eindeutig geklärt werden. In ihrem Charakter liegen sie zwischen Gruppe I und III.

Die Gruppe III soll hier besonders eingehend behandelt werden, weil alle im Rahmen dieser Arbeit als PPK aus erhitzter Milch isolierten Mikrokokken in jene eingegliedert werden konnten.

Gruppe III umfaßt die hitzeresistenten Zuckerfermentierer, die strenge Saprophyten zu sein scheinen. Sie erscheinen mit solcher Häufigkeit auf unvollständig sterilisierten Milchgeschirren, daß sie als typische Mikrokokken der Milchwirtschaft Anerkennung verdienen. Diese Gruppe ist eine charakteristische Komponente der Mikroflora in Milch, die von Geräten verunreinigt und dann wirksam pasteurisiert wird. Die Gruppe ist relativ homogen und Tabelle 5 zeigt Merkmale, in welcher sie sich von den Gruppen I und II unterscheidet. Hauptmerkmale der Organismen sind die Tendenz der Zellen, in Tetradern vorzukommen, das Wachstum auf Fleischextrakt-Agar und die Fermentation von Glukose. Diese Kombination von Merkmalen ist oft ausreichend, die Kulturen richtig in diese Gruppe zu placieren.

Gruppe III umfaßt 2 getrennte Typen: A und B.

Die Hitzeresistenz ist in der Untergruppe B größer als bei jedem anderen Mikrokokkentyp. Tabelle 6 zeigt, daß sich B von A durch verschiedene andere Merkmale unterscheidet, besonders durch ein niedrigeres Maximum der Wachstumstemperatur. Ausserdem durch ein langsames und beschränkteres Wachstum auf künstlichem Nährboden, durch die unterschiedliche Aktion in Milch und Gelatine und durch eine größere Reichweite der fermentativen Kräfte. Jede Kultur des Typs B fermentiert Glycerin und zumindest eine Pentose. Raffinose wird von dem größten Teil der Kulturen von B

fermentiert, aber von keinem anderen Micrococcus oder Staphylococcus. Ebenso war keine Pentosevergärung unter den anderen Arten nachzuweisen. Lackmusmilch gewährt eine brauchbare Unterscheidung zwischen A und B.

Beim Typ A produzieren die Mehrzahl der Stämme Säure aus Laktose und reduzieren den Lackmus mit abschließender Gerinnung. Die Veränderungen beginnen grundsätzlich in der Oberflächenschicht.

Beim Typ B ist gewöhnlich ausser einer langsamen Säurebildung keine Veränderung wahrzunehmen. Ausnahmsweise kann eine Gerinnung nach 10 oder mehr Tagen bei 30°C vorkommen.

Ein Kennzeichen der Untergruppe A ist eine kräftige grünlich-gelbe Pigmentbildung auf Lemco-Agar.

Die Farbstoffbildung verschafft somit einen brauchbaren Unterschied zu Gruppe I. Auf einem anderen Nährboden kann die Farbe zwischen den beiden Gruppen ohne Unterschied sein.

Tabelle 6: Merkmale der Gruppe III

	<u>A</u>		<u>B</u>
Wachstum auf Agar:	schnell, üppig grünlich gelb		langsam, beschränkt, blaß grünlich gelb oder unpigmentiert
Lackmusmilch:	gewöhnlich Säurebildung u. Gerinnung z.T. alkalisch		langsam säuernd, seltene langsame Gerinnung
Gelatineverflüssigung (22°C 4 Wochen)	+ z.T. -	-	-
Säure von Glycerin:	-	-	+
Säure von Xylose:	-	-	+ z.T.
Säure von Arabinose:	-	-	+ z.T.
Säure von Raffinose:	-	-	+ u.
Nitrat-Reduktion:	+ u.	-	+ u.
Wachstum m. $\text{NH}_3\text{-N}$:	+ u.	-	+ u.
Wachstum b. 37°C:	+	+	od. gering
Überleben b. 65°C 30 min.:	-	od. eine kl. Anzahl	+

Die Ergebnisse der Gelatineverflüssigung gewährleisteten keine einwandfreie Trennung. Unter den Varianten (+ u. -) in jeder Untergruppe ist in der Untergruppe A die Nitratreduktion und das Wachstum mit einem Ammoniumsalz als alleinige Stickstoffquelle das einzige Beispiel einer perfekten Verbindung von 2 Merkmalen.

Die Untergruppen A und B sind genügend getrennt und ausreichend verschieden gegenüber anderen Mikrokokken, um als 2 Arten Anerkennung zu verdienen. Entsprechend der Kennzeichnung, die für die Arten jeder Gruppe angewandt wurde, ist A konform mit *Micrococcus luteus* COHN und LEHMANN und NEUMANN und B mit *Micrococcus varians* MIGULA, 2 Arten, die auch bei BERGEY (1957) aufgeführt sind.

Verschiedene Mikrokokkenkulturen sind fast vollkommene Bindeglieder zwischen den Gruppen I und III, sie können aber nicht zufriedenstellend in eine von ihnen untergebracht werden. Es wird aber immer Zwischenarten geben, wo Trennungslinien gezogen werden. Eine klare Unterscheidung zwischen Gruppe I und III scheint wichtig zu sein, und die angenehmste Art, dies zu tun, ist die Anerkennung einer Mittelgruppe.

Die vorgeschlagene Eingruppierung bezieht sich hauptsächlich auf die Arten, die gewöhnlich massenhaft in der Milch vorkommen.

Auswertung der Ergebnisse

34 % der untersuchten 300 Milchproben enthielten Keime, die PPK bildeten. Davon entfielen 22 % auf Proben mit PPK in der rohen und der erhitzten Milch. Es handelt sich hierbei um hitzeresistente Keime. Bei der folgenden Angabe ihrer Häufigkeit wurden hier nur die aus den erhitzten Proben isolierten Keime berücksichtigt, weil sie in den meisten Fällen identisch mit den PPK der entsprechenden unerhitzten Probe sind.

12 % der PPK enthaltenden Proben wiesen PPK nur in der Rohmilch auf. Diese sind also nicht hitzeresistent.

Das Artenverhältnis der isolierten PPK, getrennt in hitzeresistente und nicht hitzeresistente Keime, verteilt sich wie folgt:

a). hitzeresistente PPK

67,2 % Milch-Mikrokokken	(34 % Typ A)
20,8 % Streptococcus thermophilus	(66 % Typ B)
10,5 % Streptococcus bovis	
1,5 % Streptococcus lactis	

b). nicht hitzeresistente PPK

39,0 % Streptococcus lactis
19,5 % Streptococcus mastitidis
16,8 % Streptococcus faecalis
14,0 % Mikrokokken
2,3 % Streptococcus cremoris
8,4 % nicht einzuordnen

Die unter a aufgeführten hitzeresistenten Arten sind somit charakteristisch für die PPK in pasteurisierter Milch. Das Auftreten von Streptococcus lactis, der in der Regel selten in pasteurisierter Milch angetroffen wird, ist damit zu erklären, daß die Proben noch unterhalb der unteren Grenze der Dauerpasteurisation bei 62°C erhitzt wurden, um das Überleben einer größeren Anzahl von PPK zu gewährleisten.

Das Artenverhältnis der nicht hitzeresistenten PPK in der Rohmilch kann sehr unterschiedlich sein, da hier die Bildung von PPK auf Platten und deren Isolierung, obgleich immer mehrere Kolonien von einer Platte isoliert wurden, durch die Vielzahl der vertretenen Arten und durch äußere Einflüsse leicht dem Zufall unterliegen können. Vor allem hängt das Ergebnis einer qualitativen Auswertung in diesem Sinne auch von der Umwelt bei der Milchgewinnung, d.h. von der Spezifität der Infektion ab.

IV. Die mathematische Auswertung des Abtötungseffektes von PPK bildenden Organismen durch Hitzeeinwirkung

Weiterhin soll in dieser Arbeit die Abtötung der vorher beschriebenen aus Milch isolierten PPK bildenden Organismen durch hohe Temperaturen einer biophysikalischen Analyse unterzogen werden, um aus den Ergebnissen das wirkungsvollste Temperatur-Zeit-Verhältnis für die Pasteurisation zu ermitteln.

1. Einführung in die Reaktionskinetik

Die Kinetik des Hitzetodes von Mikroorganismen als Reaktion hat mit der Einführung der Pasteurisierung und der Konservierung von Lebensmitteln große Bedeutung erhalten. Für die Milchwirtschaft kommt nur die Haltbarmachung durch Hitze in Frage, da das deutsche Lebensmittelgesetz den Zusatz jeden Fremdstoffes zur Milch, soweit sie als Nahrungsmittel in Verkehr gebracht wird, verbietet.

Durch Einwirkungen hoher Temperaturen ist es möglich, die Milch und alle anderen Nahrungsmittel auf längere Zeit haltbar zu machen. Da aber durch hohe Temperaturen viele Lebensmittel, wie auch die Milch, in ihrer biologischen Wertigkeit verändert werden, sind der Hitzebehandlung Grenzen gesetzt.

Von einer ordnungsgemäßen Pasteurisierung wird die Abtötung aller pathogenen und eine hohe Reduzierung der übrigen Keime gefordert unter weitgehender Erhaltung des physiologischen Wertes des Nahrungsmittels. Bei der Milch ist das die Erhaltung der Rohmilcheigenschaften, worunter die Erhaltung hitzeempfindlicher Eiweiß- und Fettkomplexe (Vitamine und Enzyme) verstanden wird.

Die Erzeugung von fast 20 Milliarden Kilogramm Milch pro Jahr im Bundesgebiet läßt erkennen, welche Bedeutung der Erhitzung der Milch zukommt.

Die Kenntnis des funktionellen Zusammenhanges von Temperatur und Zeit läßt im Temperatur-Zeitfeld eine große Anzahl von Kombinationen zu. Drei Pasteurisierungsverfahren sind

gebräuchlich (BRUNCKE 1952)

- | | | |
|------------------------|-----------------|----------------|
| 1.) Dauererhitzung : | 62 - 65°Celsius | 30 Minuten |
| 2.) Kurzzeiterhitzung: | 71 - 74°Celsius | 42-45 Sekunden |
| 3.) Hoherhitzung: | 85°Celsius | 8-16 Sekunden. |

Die Uperisation (150°C für 0,75 Sekunden) wird z.Z. erst probeweise betrieben. Sicher wird sie wegen der hohen Betriebskosten auch in Zukunft nur bei einem kleinen Anteil der zu verarbeitenden Milch Anwendung finden.

Zur Ermittlung des Pasteurisierungseffektes vergleicht man in der Bundesrepublik die Erhitzergeräte mit der Leistung eines Normalerhitzers. Zur bloßen Registrierung des Pasteurisierungseffektes reicht dieses aufwendige Verfahren. Es gestattet aber nicht, einen tieferen Einblick in den Ablauf der Milcherhitzung zu erhalten. Die Hitzeresistenz von Mikroorganismen, ihre Reaktionen unter dem Einfluß äusserer Faktoren wie auch der Mechanismus der Abtötung sind Fragen, die mit Hilfe der Biophysik beantwortet werden können. Ihre Methoden ermöglichen es, das Geschehen bis in die Feinstrukturen der Lebewesen zu verfolgen.

Schon zu Beginn des vorigen Jahrhundert wurde die Hitze zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt. APPERT führte 1810 die Konservierung durch Kochen ein. PASTEUR wies nach, daß durch Erhitzen von Milch auf 60°C deren Säuerung erheblich verzögert wird. 1893 beobachtete WEIGMANN, daß Tbc-Bakterien beim Erhitzen der Milch auf 67°C vollständig abgetötet werden. Diese Untersuchungen führten zu der Annahme, daß der Hitzetod von Mikroorganismen durch einen bestimmten Abtötungspunkt festgelegt sei. IKEDA (1896), NYMAN und MADSEN (1907), PAUL und KRÖNIG (1907) CHICK (1908), REICHENBACH (1911) RAHN (1929) bewiesen aber, daß die Abtötung als ein zeitlicher Prozeß zu betrachten ist. Seitdem ist der funktionelle Zusammenhang zwischen Absterbeschwindigkeit und der Temperatur bekannt. Weitere Untersuchungen behandelten die Frage, ob der Abtötung von Bakterien auch die Gesetzmäßigkeit einer monomolekularen Reaktion zugeordnet werden kann. Trifft dies zu, dann erhält man bei der graphischen

Darstellung des Absterbevorganges im halblogarithmischen Raster eine Gerade, deren Neigung von der Temperatur abhängig ist. Daraus resultiert, daß in gleichen Zeitabschnitten immer ein bestimmter Bruchteil der noch nicht reagierten Einheiten (Organismen) abgetötet wird.

Eine monomolekulare Reaktion setzt voraus, daß der Zelltod auch dann möglich ist, wenn nur ein einziges lebenswichtiges Molekül der Zelle zerstört wird, und daß die Resistenz der Bakterienmasse einheitlich ist. Obgleich allgemein anerkannt wird, daß der Zelltod schon durch Wegfall eines für die Vermehrung notwendigen Gens eintreten kann, werden von verschiedenen Autoren (LEMKE, CHRISTOPHERSEN, WÄLZHOLZ, ANDERSEN, REICHENBACH) Abweichungen von der Gesetzmäßigkeit mit der unterschiedlichen Resistenz einer Bakterienpopulation erklärt. Auch konnten die von RAHN, BEAMER und TANNER beobachteten Abweichungen vom monomolekularen Reaktionsablauf zunächst nicht eindeutig geklärt werden. Erst die Arbeiten von JANOSCHEK (1953) und seinen Mitarbeitern, sowie PUGSLEY, EDDY, ODDY, zit. bei DESSAUER (1954) konnten die oft auftretenden Abweichungen erklären. Genannte Autoren griffen die von CHICK (1908) und RAHN (1929) gegebenen Erklärungen auf und entwickelten sie weiter zur Quantenbiologie. Danach ist der Absterbevorgang einer Bakterienpopulation nicht eine Reaktion direkter Kausalität, sondern er unterliegt den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit. Das Einwirken der Hitze verläuft nicht kontinuierlich, sondern in einzelnen Energiequanten, die Einzelreaktionen hervorrufen, wenn sie das Steuerungszentrum eines Mikroorganismus irreversibel schädigen. Daraus kann gefolgert werden, daß die Wahrscheinlichkeit einer Bakterienschädigung von der Konzentration der Energiequanten als auch von der Konzentration der Keime abhängt. Diese Erkenntnisse entsprechen den Vorstellungen der Treffertheorie (CHARM 1957).

DESSAUER (1922) verwertete als erster diese Gedankengänge in seiner Theorie zur Erklärung der biologischen Strahlenwirkung. Nach seiner Annahme besitzt die biologische Substanz bestimmte

strahlenempfindliche Bezirke, die durch Absorption von Energiequanten irreversibel verändert werden. Für die Entstehung einer solchen Veränderung ist somit eine bestimmte Anzahl elementarer Einzelvorgänge notwendig. Daraus ergibt sich, daß eine merkbare Reaktion dann stattgefunden hat, wenn quantenhafte Einheiten der Noxe und des Organismus sich getroffen und reagiert haben.

Wie in der Kernphysik liegen dem Trefferprinzip mikrophysikalische Vorgänge zugrunde. Nach NEWTON unterliegt das Entstehen solcher Einzelvorgänge den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit. Aber nur bei einer großen Anzahl von Beobachtungen ist die Anwendung des Wahrscheinlichkeitsgesetzes sinnvoll. Dazu dient die Statistik, denn erst die Summe von statistisch erfaßten akausalen Einzelereignissen ergibt das streng kausale Gesamtgeschehen.

Die Aufgabe der Biophysik ist es, die grundlegenden biologischen Vorgänge und Strukturen auf mathematischem, physikalischem und theoretischem Wege zu analysieren (TIMOFEEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1947).

Natürlich sind der Biophysik und ihren Methoden auch Grenzen gesetzt. Der Ablauf biologischer Reaktionen ist meist von störenden Nebenreaktionen begleitet, die leicht zu Fehlurteilen führen können.

Die Zahl der zu einer Reaktion gekommenen biologischen Einheiten kann zu einem bestimmten Zeitpunkt recht unterschiedlich sein. Bei anhaltender Noxeneinwirkung erhalten immer mehr Einheiten die nötige Mindestzahl von Treffern. Die Reaktion zeigt eine stetige Abnahme der noch nicht reagierten Einheiten. Der Prozentsatz der nicht reagierten Einheiten, in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt, entspricht einer Exponentialfunktion (CHICK 1908, RAHN 1929).

BLAU und ALTENBURGER (1929) stellten als erste eine mathematische Schädigungsformel im Sinne der Treffertheorie zur Formulierung eines monomolekularen Geschehens auf.

Wie ist nun die Frage, wo findet ein Treffer statt, zu beantworten? Neben dem Begriff des Treffers tritt der des Treffbereiches. Ebenso wie unbelebte Körper ist auch die Zelle von einer großen Anzahl von Atomen und Molekülen aufgebaut, aber gleichzeitig enthält sie im Zellkern mit seinen ebenfalls aus Atomen und Molekülen aufgebauten Genen und Chromosomen ein streng geordnetes Steuerungssystem. Kleinste Veränderungen in diesem System infolge mikrophysikalischer Reaktionen können große makrophysikalische Folgen hervorrufen. Somit kann eine einzige quantenphysikalische Reaktion den Tod der Zelle herbeiführen. Das bedeutet, daß die Zelle, als Einheit betrachtet, quantenhaft reagieren kann. Andere Einheiten, die quantenhaft reagieren können, sind Zellverbände, einzelne Organe und vielzellige Organismen.

Viele weitere theoretische und experimentelle Ergebnisse (GLOCKER, BRAUN und HOLTHUSEN, TIMOFEEFF, RESSOVSKY, ZIMMER und DELBRÜCK) führten zu der Überzeugung, daß als Treffbereich nur die Chromosomen bzw. Gene infrage kommen können. Damit ist aber nicht gesagt, daß der die Reaktion auslösende Treffer am Gen selbst erfolgen muß.

Treffer können ausgelöst werden durch die Entstehung eines Ionenpaares bei Bestrahlung und Hitze oder durch Molekülanlagerung chemischer Noxen. Alle Schädigungsreaktionen sind somit einer treffertheoretischen Analyse zugänglich (JORDAN 1940).

JANOSCHEK (1953) zeigte die Beziehungen der Gesetzmäßigkeit der Treffertheorie zu dem für die unbelebte Materie gültigen Massenwirkungsgesetz von GULDBERG und WAAGE auf. Hierbei ist das Treffergesetz als ein Sonderfall des Massenwirkungsgesetzes zu verstehen, welches besagt, daß die Geschwindigkeit des Ablaufs einer chemischen Reaktion dem Produkt der Konzentration der reagierenden Stoffe proportional ist. Bei einer Reaktion verringert sich die Masse oder die Konzentration beider Reaktionsbestandteile, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. das Produkt immer kleiner wird. Gestützt von der Annahme, die auch weitgehend für die Verhältnisse in der

Natur zutrifft, daß einer der Reaktionspartner praktisch nicht verbraucht wird, formulierte JANOSCHEK (1953), ausgehend vom Massenwirkungsgesetz, die statistisch erfaßbaren biologischen Abläufe mathematisch. Diese mathematische Formulierung setzt voraus, daß die beobachteten Reaktionsabläufe (Abtötung, Wachstum, Vermehrung und Leistung) als monomolekulare Reaktion ablaufen.

Viele Wissenschaftler, die die unterschiedliche Resistenz einer Population und ihre Variabilität überbewerten, lehnten diese Auffassung ab. So konnten auch anfangs verschiedene Versuchsergebnisse der Quantenbiologie (RAHN 1929) nicht eindeutig geklärt werden. Erst durch die von JANOSCHEK ausgearbeitete Mathematik war eine Deutung möglich. Seine Untersuchungen und andere (ZIRKLE und TOBIAS 1953, VOERKELIUS 1954) zeigten, daß der Ablauf einer biologischen Reaktion grundsätzlich auch vom Ploidiegrad abhängig ist. Dadurch können auch Reaktionen erklärt werden, die nicht als Eintreffergeschehen im eigentlichen Sinne ablaufen. Es wird unterschieden zwischen einer Eintrefferreaktion und einer Mehr-Eintrefferreaktion.

Eine Eintrefferreaktion (monomolekulare Reaktion) liegt vor, wenn ein oder mehrere Treffbereiche je Einheit vorhanden sind, aber nur einer davon getroffen werden braucht, damit die Reaktion zustande kommt (haploide Organismen).

Eine Mehr-Eintrefferreaktion liegt vor, wenn zwei oder mehrere Treffbereiche vorhanden sind und davon mehr als einer getroffen werden muß, damit die Reaktion erfolgt (di- und polyploide Organismen).

Eine Mehrtrefferreaktion liegt vor, wenn ein Treffbereich gleichzeitig mehrmals getroffen werden muß. Sie ist aber biologisch kaum vorstellbar.

Aus dieser Definition ist zu entnehmen, daß ein di- oder polyploider Organismus die entsprechende Mindestzahl an Treffern in seinem Treffbereich erhalten muß, um unter dem Einfluß einer Noxe zu reagieren (JANOSCHEK 1955). Ob eine Eintrefferreaktion

oder eine Mehr-Eintrefferreaktion vorliegt, ist aus der graphischen Darstellung der Reaktionsabläufe ersichtlich. Ein Reaktionsablauf, dem ein einfaches Eintreffergeschehen zugrunde liegt, erscheint im doppeltlogarithmischen Raster als eine gerade Linie. Bei einer Mehr-Eintrefferreaktion erscheint der Reaktionsablauf als Kurve. Wieviel Rezeptoren pro Einheit mindestens einmal reagieren müssen, damit die Einheit die erwartete Reaktion zeigt, wird durch den Wert m angegeben. Der m -Wert wird bestimmt entweder durch den Ploidiegrad, die mittlere Zellzahl oder das Produkt von beiden, also bezogen auf eine einzelne reaktionsfähige Einheit. Bei einem Eintreffergeschehen ist $m = 1$. Wird bei einer Mehr-Eintrefferreaktion der Wert m mathematisch auf 1 reduziert, dann wird die diesem Geschehen zugeordnete Reaktion in der graphischen Darstellung zu einer geraden Linie gestreckt.

Diesem Fehler unterlagen auch die Versuche von REICHENBACH (1911), wie von SCHULZ (1957) nachgewiesen wurde. Letzterer berechnete nochmals mit Hilfe eines von JANOSCHEK (1955) nach einem Ansatz von GLOCKER (1932) aufgestellten Nomogramms die Versuche REICHENBACH's. Dabei ergab sich, daß die verwendeten *Bacillus-anthraxis*-Kulturen eine leichte Klumpung aufgewiesen haben und zwar mit einer mittleren Zellenzahl von 1,6 je Klumpen. Kulturen mit Zellkonglomeraten folgen aber genau so wie di- und polyploide Organismen keinem monomolekularen Reaktionsablauf. Sie täuschen bei gleicher Reaktionsbereitschaft der einwirkenden Noxe eine höhere Resistenz vor, wie auch deutlich aus den Untersuchungen mit PPK- Kulturen hervorgeht (siehe Abb. 13-17). Die Verzögerung dieser Reaktion äussert sich in der halblogarithmischen Darstellung in einer konvexen Krümmung zur Abzisse hin. Die Krümmung der Kurve ist um so stärker, je höher der Ploidiegrad oder die mittlere Zellzahl je Klumpen ist. Nach Vereinzelung der Konglomerate gelingt es, für die Absterbereaktion Eintrefferkurven zu erhalten.

Das Reaktionskinetische Grundgesetz

Sowohl in der unbelebten als auch in der belebten Natur werden Reaktionsabläufe vornehmlich von 3 Faktoren beeinflusst: der Zeit, der Konzentration oder Dosisleistung und vom Milieu, dessen Einfluß bei biologischen Reaktionen besonders groß ist.

Die Zeitabhängigkeit

Die Wirkung in Abhängigkeit von der Zeit erfaßt den Ablauf einer Reaktion bei variiertter Zeit und konstanter Dosis der Noxe. Bei einer monomolekularen Reaktion gelangt in einer Zeiteinheit immer ein bestimmter Bruchteil der noch nicht reagierten Einheiten zur Reaktion. Wird in einem numerischen Raster auf der y-Achse der Prozentsatz der reagierten Einheiten und auf der x-Achse die Zeit abgetragen, so ergibt die graphische Darstellung eine Kurve, die sich asymptotisch dem Endwert nähert.

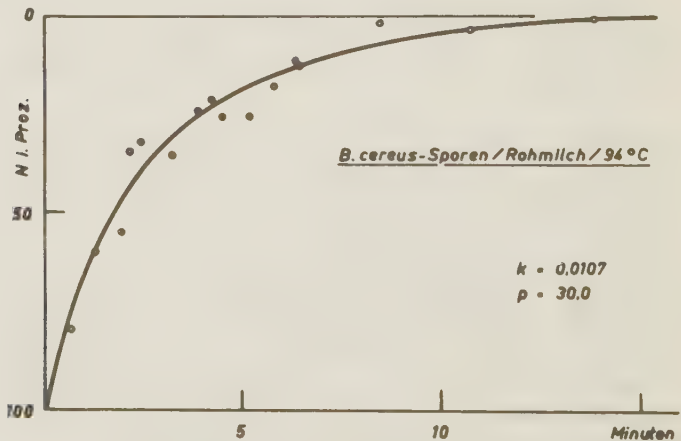


Abb. 2: Der Hitzetod von *Bacillus cereus*-Sporen in Rohmilch in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur (94°C), dargestellt im numerischen Raster.

Überträgt man die Kurve aus dem numerischen Raster in einen halb-logarithmischen -logarithmiert wird der Prozentsatz der nicht reagierten Einheiten- erhält man eine Gerade. Die Geschwindigkeit mit der eine zeitabhängige Reaktion abläuft, wird durch die Steigung dieser Geraden erfaßt, deren allgemeine Gleichung $y = a.x$ lautet.

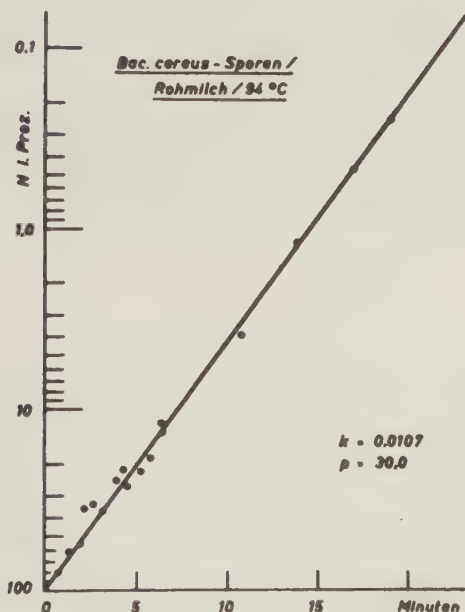


Abb.3: Der Hitzetod von *Bacillus cereus*-Sporen in Rohmilch in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur (94 °C), dargestellt im halb-logarithmischen Raster.

Wird die Anzahl der Einheiten zu Beginn der Reaktion mit $N_0 = 100\%$ und die Anzahl der während der Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt reagierten Einheiten mit N_t und die der nicht reagierten

Einheiten mit N bezeichnet, kann für y geschrieben werden:

$$\log N_0 - \log N = a \cdot x \text{ oder } \log N - \log N_0 = -a \cdot x$$

Da auch biologischen Reaktionen quantenhafte Einzelvorgänge, die akausal erfolgen, zugrundegelegt werden können, ist der Faktor a für eine Gerade genau definiert.

$$\text{für } x = t \text{ gesetzt: } \log N - \log N_0 = -a \cdot t$$

Als Bezugspunkt wird auf der Ordinate die Zahl e bzw. $\log e$ gewählt, der eine bestimmte Zeit, eine Konstante k_t , entspricht. Demnach ist $a = \lg(e) = \log e \cdot k_t$

Diesen Ausdruck in die Gleichung für die Gerade eingesetzt und die x -Achse als Zeitachse ($x=t$) bezeichnet, ergibt:

$$\log N - \log N_0 = -\log e \cdot k_t \cdot t$$

de logarithmiert

$$N/N_0 = e^{-k_t \cdot t}$$

$$N = N_0 \cdot e^{-k_t \cdot t} \quad (N = N_0 - N_+)$$

$$N_0 - N_+ = N_0 \cdot e^{-k_t \cdot t}$$

$$N_+ = N_0 - N_0 \cdot e^{-k_t \cdot t}$$

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k_t \cdot t} \right] \quad (1)$$

Setzt man in dieser Gleichung für $k_t \cdot t = 1$, so erhält man für $N_+ = 63,212\%$ reagierter Einheiten; und da $k_t = 1/t$ ist, entspricht k_t dem reziproken Wert jener Zeit, in der die Reaktion zu 63,212% abgelaufen ist.

Der Ausdruck $e^{-k_t \cdot t}$ erfaßt die Akausalität des beschriebenen Vorganges, er gibt nach NEWTON die Wahrscheinlichkeit an, daß ein bestimmtes Geschehen noch nicht erfolgt ist.

Von den verschiedenen mathematischen Formulierungen für einen monomolekularen Reaktionsablauf konnte nach WEINFURTER und JANOSCHEK (1953) nur diese von GLOCKER (1922) befriedigen.

Sie wurde von JANOSCHEK erweitert:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k_t \cdot t} \right]^m$$

Hierbei bedeutet m die Zahl der Rezeptoren pro Einheit, die mindestens einmal reagieren müssen, damit die erwartete Reaktion eintritt. Somit ist durch m auch der Ploidiegrad gekennzeichnet. k_t ist eine Geschwindigkeitskonstante, sie gibt den reziproken Wert der Zeit an, in der für $m = 1$ genau 63,212 Prozent der reaktionsfähigen Organismen reagiert haben. Werden Zeitkurven nach dem genannten Ansatz für verschiedene Werte von m im halblogarithmischen Raster graphisch dargestellt, so ergibt sich die in Abb. 3 wiedergegebene Kurvenschar. Da allen Kurven das gleiche k_t zugrunde liegt, nähern sie sich asymptotisch Geraden mit gleichem Neigungswinkel. Die Dosis wird nicht erfaßt.

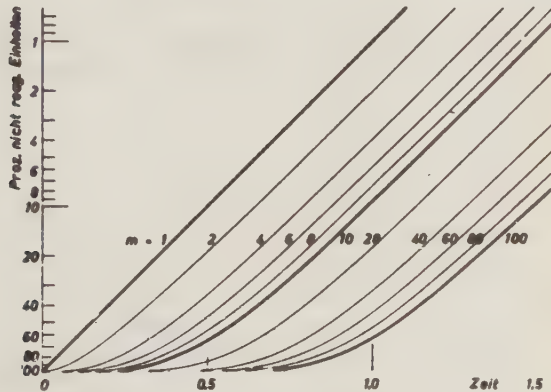


Abb.4: Zeitkurven nach dem Ansatz von GLOCKER mit gleicher Reaktionskonstante k_t und unterschiedlichem m im halblogarithmischen Raster (n.JANOSCHEK, 1955).

Die Dosisabhängigkeit

Die Charakterisierung der Wirkung einer Noxe nur nach der Zeit ist sehr einseitig, da die Dosisabhängigkeit ebenfalls einen integrierenden Faktor darstellt. Erst JANOSCHEK (1955) konnte nachweisen, daß zwischen Dosis und Wirkung einer Noxe ein mathematisch erfaßbarer Zusammenhang besteht. Die Darstellung der Wirkung einer Noxe bei konstanter Zeit und variierteter Dosis in einem halblogarithmischen Raster ergibt eine Dosiskurve in Parabelform, deren Krümmung ein Charakteristikum der Noxe ist, wenn $m = 1$ ist oder auf 1 reduziert wurde (Abb.5).

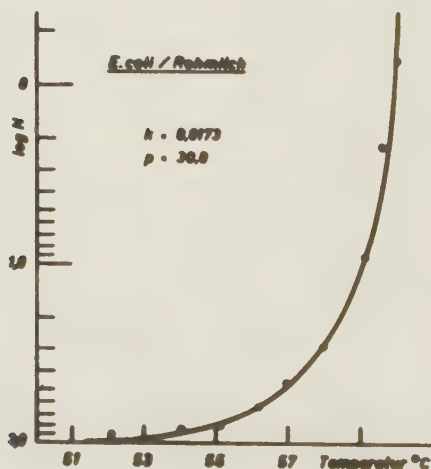


Abb.5: Der Hitzetod von E.coli in Rohmilch in Abhängigkeit von der Temperatur bei gleicher Einwirkungsdauer (5 Min.) dargestellt im halblogarithmischen Raster.

Bei einer Reaktion bei konstanter Zeit und veränderlicher Konzentration einer Noxe, wobei diese praktisch nicht verbraucht wird, könnte der Ablauf ebenso mathematisch formuliert

werden wie eine zeitabhängige Reaktion bei konstanter Dosis.

Für $t = d$ gesetzt, gilt:

$$N_+ = N_0 \cdot \left(1 - e^{-k_d \cdot D} \right)$$

Diese Gleichung formuliert aber im halblogarithmischen Raster eine Gerade und genügt nicht zur Beschreibung der parabelähnlich gekrümmten Dosiskurve. Wird jedoch die Dosiskurve, wenn $m = 1$ ist, in einem doppeltlogarithmischen Raster eingezeichnet (Abb. 6), - die N_+ -Werte der y-Achse werden nochmals logarithmiert ($y = \log (2 - \log N)$) und auf der x-Achse werden die Dosiswerte logarithmisch abgetragen ($x = \log Dosis$), - so ergibt sich eine gerade Linie, die durch folgende Gleichung beschrieben werden kann:

$$y = c + p \cdot \log D$$

$$\text{für } \log D = x$$

$$y = c + p \cdot x$$

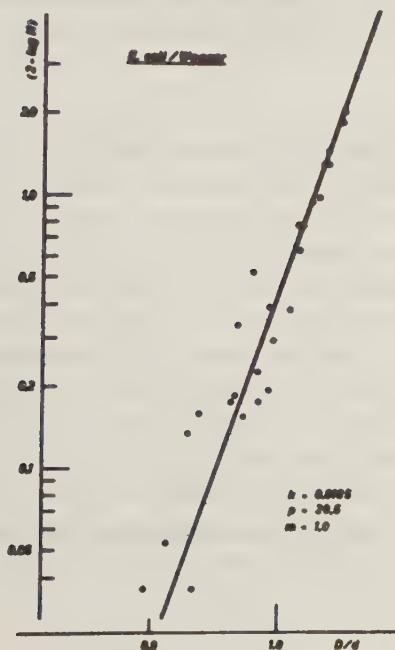


Abb. 6: Der Hitzetod v. E. coli in Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur bei gleicher Einwirkungsdauer (5 Min.) dargestellt im doppeltlogarithmischen Raster.

Da die Zeit bei dosisabhängigen Reaktionen konstant ist, wird die Neigung (Tangens) der Geraden durch den Faktor p erfaßt. Die Neigung der Geraden im doppeltlogarithmischen Raster entspricht der Krümmung der Linie im halblogarithmischen Raster. Die Krümmung der Linie ist dahingehend deutbar, daß zunächst die Zelle der Noxeneinwirkung durch Abwehrreaktion entgegenwirkt. Bei zunehmender Noxeneinwirkung wird das Abwehrsystem der Zelle überfordert, die Wirkung steigt potentiell mit der Dosis an. Der potentielle Anstieg könnte auch durch eine Anreicherung der Noxe in der Zelle verursacht werden. Der Ausdruck p beschreibt diese Wechselwirkung zwischen Zelle und Noxe; er charakterisiert somit die Noxe.

Durch die Konstante p ist eine befriedigende Beschreibung der Dosiskurve möglich. Die mathematische Formulierung lautet:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{- (k_d \cdot D)^p} \right] \quad (2)$$

Nachfolgende Ableitung beweist, daß diese Formulierung einer Geraden entspricht. Gleichung (2) durch N_0 dividiert ergibt:

$$N_+/N_0 = 1 - e^{- k_d^p \cdot D^p}$$

$$N_+/N_0 - 1 = - e^{- k_d^p \cdot D^p}$$

$$1 - N_+/N_0 = e^{- k_d^p \cdot D^p}$$

Dafür kann auch geschrieben werden:

$$(N_0 - N_+) / N_0 = e^{- k_d^p \cdot D^p}$$

$$\text{da } N_0 - N_+ = N$$

$$N/N_0 = e^{- k_d^p \cdot D^p}$$

Da $N_0 = 100$ und $\log 100 = 2$ ist, ergibt sich nach Logarithmierung

$$\log N - 2 = - \log e \cdot k_d^p \cdot D^p$$

Änderung der Vorzeichen:

$$2 - \log N = \log e \cdot k_d^p \cdot D^p$$

Eine nochmalige Logarithmierung ergibt:

$$\log (2 - \log N) = \log \log e + p \cdot \log k_d + p \cdot \log D$$

$$\log (2 - \log N) = \log \log e + p \cdot (\log k_d + \log D)$$

Der Ausdruck $\log (2 - \log N) = y$, der Ausdruck $\log \log e = c$ und für $p \cdot (\log k_d + \log D) = p \cdot x$ gesetzt, ergibt eine Gleichung, die eine Gerade formuliert:

$$y = c + p \cdot x$$

Hierbei ist c ein Maß für die Parallelverschiebung der Geraden auf der x -Achse. Der Wert p kann aus der Steigung der Geraden bestimmt werden.

Da die Wechselbeziehungen zwischen dem Plasma einer Zelle und der Noxe weitgehend von der Art der Noxe bestimmt werden, charakterisiert eine Dosiskurve für $m = 1$ hauptsächlich die einwirkende Noxe.

Wodurch ist nun der unterschiedliche Verlauf einer Zeit- und Dosiskurve im halblogarithmischen Raster zu erklären? JANOSCHEK meint, daß die Beobachtung des Reaktionsablaufes bei veränderlicher Zeit und konstanter Dosis die spezifische Noxenwirkung nicht erfaßt. Weil jeder Organismus bei einer konstanten Dosisleistung nur gleichartig reagieren kann, ist es durch ein Zeitkurve nicht möglich, den spezifischen Einfluß der Noxenleistung zu erfassen. Bei fortschreitender Zeit reagieren immer mehr Organismen mit der konstanten Dosisleistung und folgen damit den Gesetzen der Treffertheorie. Bei konstanter Zeit und zunehmender Dosis sind die Organismen immer anderen Noxenkonzentrationen ausgesetzt, mit denen sie in der beschriebenen Weise reagieren können. Die Dosiskurve im halblogarithmischen Raster kennzeichnet vorwiegend die Reaktion der Organismen mit verschiedenen

Noxenkonzentrationen und bringt das vor allem zeitabhängige Treffergeschehen nicht deutlich zum Ausdruck.

Da Reaktionsabläufe, wie beschrieben, von der Zeit und der Dosis beeinflußt werden, liegt es nahe, die Ansätze für zeit- und dosisabhängige Reaktionen in einer Gleichung zu vereinigen. Es besteht die enge Wechselbeziehung, daß jedem Punkt einer Dosiskurve eine Zeitkurve zugeordnet ist und umgekehrt. Weil jede Zeitkurve durch ein unterschiedliches k_t charakterisiert ist, kann die y-Achse im halblogarithmischen Raster der Dosiskurven auch nach k_t unterteilt werden (Abb.7).

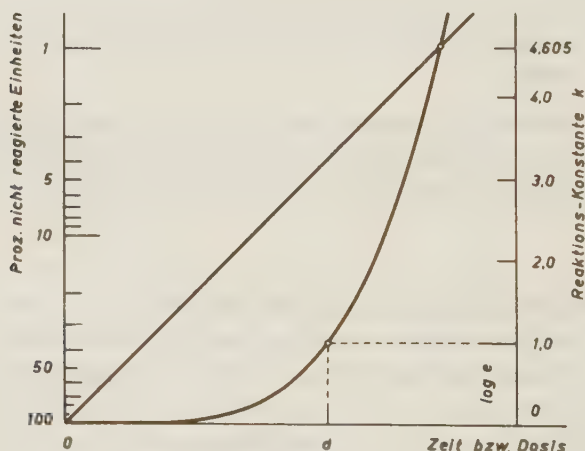


Abb.7: Die Dosis- und Zeitabhängigkeit biologischer Reaktionen (n.JANOSCHEK, 1955)

Für Geraden, die nicht durch den Nullpunkt gehen analog den Dosiskurven im doppeltlogarithmischen Raster gilt:

$$x/a_x - y/b_y = 1$$

$$y = b_y/a_x \cdot x - b_y$$

für $y = \log k_t$ gesetzt:

$$\log k_t = b_y/a_x \cdot x - b_y$$

$$\log k_t = b_y/a_x \cdot x - a_x \cdot b_y/a_x$$

$$\log k_t = b_y/a_x \cdot (x - a_x)$$

Der Wert b_y/a_x entspricht dem Tangens des Neigungswinkels der Geraden, der mit p bezeichnet wird. Da die Dosiswerte auf der x -Achse logarithmisch abgetragen sind, kann für $x = \log D$ gesetzt werden. Der Wert a_x gibt den Punkt an, in dem die Gerade die x -Achse schneidet und entspricht dem Wert für d im halblogarithmischen Raster. Daraus folgt:

$$\log k_t = p \cdot (\log D - \log d) \text{ oder } k_t = (D/d)^p$$

d in Abhängigkeit von $\log \log e$ bestimmt, ergibt für eine Noxe bei der Einwirkungszeit $t = 1$ einen konstanten Wert und ist somit ein Maß für die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes, deshalb kann für $1/d = k$ gesetzt werden. Daraus ergibt sich:

$$k_t = k^p \cdot D^p = (k \cdot D)^p$$

Diesen Ausdruck in die von JANOSCHEK erweiterte Gleichung für Zeitkurven

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k_t \cdot t} \right]^m$$

eingesetzt ergibt:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^p \cdot D^p \cdot t} \right]^m \quad (3)$$

Damit sind die Ansätze für zeit- und dosisabhängige Reaktionen in einer Gleichung vereint, sie beschreibt durch die Parameter p , k und m die Kinetik der Wirkung einer Noxe hinsichtlich der Zeit und der Dosis zugleich.

Der m-Wert

Alle abgehandelten mathematischen Formulierungen gelten nur unter der Voraussetzung, daß biologische Reaktionen im Prinzip einem monomolekularen Reaktionsablauf folgen. Für Abweichungen von diesem Reaktionsablauf ist das Kernphasenverhältnis oder ein Vorliegen von Zellverbänden verantwortlich. Bei Zellverbänden entspricht m , mathematisch gedeutet, dem Produkt aus Ploidiegrad und durchschnittlicher Zellenzahl pro Verband. Die durchschnittliche Zellenzahl kann man durch Auszählen unter dem Mikroskop ermitteln. Die Ermittlung des m -Wertes kann auch graphisch aus der Darstellung einer experimentell erstellten Zeitkurve erfolgen (Abb.8).

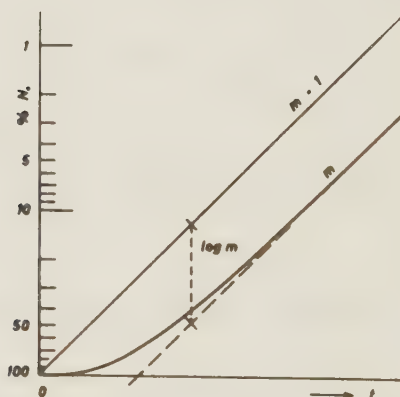


Abb.8: Bestimmung des Wertes m im halblogarithmischen Raster.

Zu dem asymptotisch verlaufenden Teil der Zeitkurve wird eine Parallele gelegt, die durch den 0-Punkt geht. Damit ist sie dem Wert $m = 1$ zugeordnet. Im parallel verlaufenden Teil beider Linien wird von der Geraden $m = 1$ das Lot auf die x-Achse gefällt. Der Abstand beider Linien entspricht $\log m$ und de-logarithmiert dem der Versuchskurve zugeordneten m -Wert.

Ausserdem ist die Reduktion der m-Werte auf $m = 1$ rechnerisch möglich.

Hierbei wird von dem folgenden Ansatz ausgegangen:

$$N_{m+} = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^p \cdot D^p \cdot t} \right]^m$$

$$N_{m+} / N_0 = \left[1 - e^{-k^p \cdot D^p \cdot t} \right]^m$$

$$\sqrt[m]{N_{m+} / N_0} = 1 - e^{-k^p \cdot D^p \cdot t}$$

Die Zahl der reagierten Einheiten einer Reaktion mit m-Treffbereichen mit N_{m+} und die zugeordnete Zahl für $m = 1$ mit N_+ bezeichnet, ergibt:

$$\sqrt[m]{N_{m+} / N_0} = N_+ / N_0$$

Mit diesem Ansatz kann jeder erhaltene N_{m+} -Wert umgerechnet werden. Die erhaltenen N_+ -Werte entsprechen einer monomolekularen Reaktion, und nur diese ermöglicht eine weitere Analyse von Dosiskurven.

Die Konstanten p und k

Die Krümmung einer Dosiskurve im halblogarithmischen Raster oder die Steigung der Dosis-Geraden im doppeltlogarithmischen Raster wird für $m = 1$ bestimmt durch den Faktor p. Er kann errechnet oder aus der Darstellung im doppeltlogarithmischen Raster als Steigung der Geraden-denn p entspricht dem Tangens des Neigungswinkels- direkt abgelesen werden. Errechnet wird p, ausgehend von zwei beliebigen Punkten der Geraden (y_1 und x_1 bzw. y_2 und x_2) folgendermaßen:

$$(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = \text{tg } \alpha = p$$

Die Konstante k kann mathematisch aus der Gleichung :

$2 - \log N = (k \cdot D)^p \cdot t \cdot \log e$
abgeleitet werden.

p und t = 1 gesetzt und für D = d, in Abhängigkeit des y-Wertes log e, ergibt:

$$2 - \log N = k \cdot d \cdot \log e$$

Setzt man für $2 - \log N = y$ und für $k \cdot d = c$, so ergibt sich die Gleichung einer Geraden, in der $c = \lg d$ ein Maß für den Anstieg der Geraden ist:

$$y = c \cdot d$$

Daraus ergibt sich:

$$c = \log e / d = k \cdot \log e$$

Demnach gilt auch $1/d = k$

Der Wert d ist diejenige Dosis, die dem y-Wert $\log e = 0,4343$ entspricht. Im doppeltlogarithmischen Raster wird zur Bestimmung von k der y-Wert $\log \log e = 0,638-1$ aufgesucht, und von dem dazugehörigen Wert $\log d$ der Numerus gebildet, dessen reziproker Wert der Konstanten k entspricht. k gibt immer den reziproken Wert derjenigen Dosis an, bei welcher in der Zeiteinheit $t = 1$ 63, 212 % der Organismen reagiert haben (für $m = 1$).

Bei einer Reaktion, in der t und p > 1 sind (Abb.9) ist für die Bestimmung des k-Wertes folgende Umrechnung erforderlich:

$$p = (\log t)/b \quad \text{oder} \quad b = (\log t)/p$$

$$\log d = \log d_t + (\log t)/p$$

$$\log d = \log (d_t \cdot \sqrt[p]{t})$$

$$d = d_t \cdot \sqrt[p]{t}$$

$$k = 1/d = 1/ (d_t \cdot \sqrt[p]{t})$$

Die Bestimmung von k erfolgt, wenn $t > 1$, auch über d in Abhängigkeit von $\log \log e$, nur ist eine Korrektur mit dem Faktor $\sqrt[p]{t}$ notwendig.

Entsprechend kann k auch aus einem zeitabhängigen Reaktionsablauf (s.S.45) ermittelt werden.

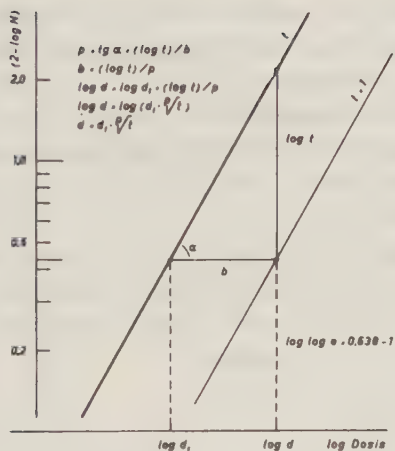


Abb.9: Bestimmung des d-Wertes im doppeltlogarithmischen Raster, wenn $t > 1$.

Die mathematische Formulierung des Reaktionsablaufes in einem Milcherhitzer, wobei Zeit und Temperatur gleichzeitig und gleichsinnig verändert werden.

Bei den auf S.30 angegebenen Erhitzungsverfahren wird die Milch zeitabhängig auf die durch eine Verordnung festgesetzte Temperatur erhitzt. Obwohl dieser Vorgang sehr schnell vonstatten geht, erfolgt er nicht sprunghaft. Die mathematische Formulierung des Reaktionsablaufes stützt sich auf die Voraussetzung, daß durch die besondere Konstruktion der Erhitzer jedes Milchteilchen eine bestimmte Zeit den vorgeschriebenen Temperaturen der einzelnen Verfahren ausgesetzt ist.

Der Pasteurisierungsvorgang erfolgt in der Praxis in zwei wärmetechnisch verschiedenen Abschnitten: einmal durch Erwärmung in den Austauschern im Gegenstromprinzip durch bereits erhitzte Milch, zum anderen in der Erhitzerabteilung durch Fremdwärme. Ausgehend von der Idealform des Gegenstromprinzips, wobei Temperatur und Zeit in einem konstanten Verhältnis zueinander stehen, $t/T = c$, d.h. in gleichen Zeiteinheiten wird immer der gleiche Temperaturanstieg erreicht, gelang es FESSEN (1962), den Pasteurisierungsvorgang im Labor nachzuahmen.

Für einen solchen Reaktionsablauf, bei dem die Temperatur mit der Zeit gleichsinnig und linear ansteigt, dient als Grundlage der mathematischen Formulierung der oben beschriebene Ansatz (3) von JANOSCHEK.

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^P \cdot D^P \cdot t} \right] \quad m \quad (3)$$

Dieser Ansatz formuliert einen Ablauf, bei dem entweder nur die Temperatur oder nur die Zeit veränderlich ist.

In Abb.10 sind im halblogarithmischen Raster die beiden genannten Reaktionsabläufe in einer Zeichnung dargestellt.

- 1) für die Wirkung in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur, wenn beide gleichzeitig und gleichsinnig ansteigen, wobei das Temperatur-Zeitverhältnis konstant bleibt, $t/T = c$.
- 2) für die Wirkung in Abhängigkeit von der Temperatur = T bei konstanter Einwirkungsdauer = t, wobei $t = 1$ ist.

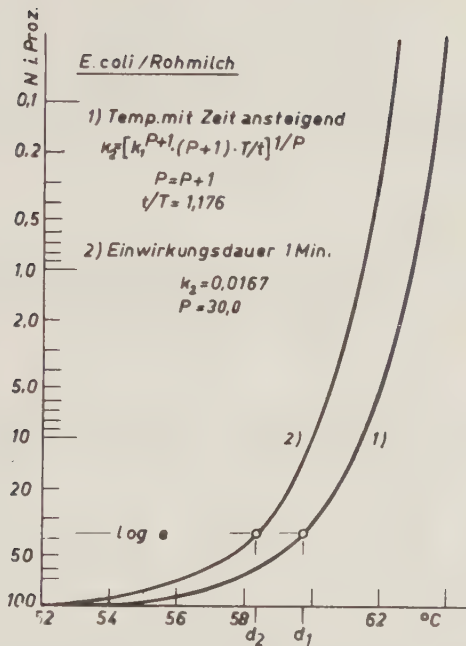


Abb.10: Der Hitzetod von E.coli in Rohmilch, dargestellt im halblogarithmischen Raster

- 1) wenn die Temperatur mit der Zeit linear ansteigt,
- 2) in Abhängigkeit von der Temperatur bei gleicher Einwirkungsdauer.

Als Bezugspunkt für beide Reaktionsabläufe dient wieder der Wert $y = \log e$. Der Reaktionsablauf 2 folgt dem Ansatz (3), der, wenn $m = 1$, lautet:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k_2^D \cdot T^D \cdot t} \right]$$

dafür kann allgemein geschrieben werden

$$N/N_0 = y_2 = e^{-k_2 \cdot T_2^p \cdot t_2}$$

Hierbei kann nur T oder t verändert werden, wobei immer die andere Größe konstant bleibt. Werden jedoch T und t zugleich verändert, d.h. in gleichen Zeiteinheiten wird immer der gleiche Temperaturanstieg erreicht, dann ist T^p eine Funktion von t. In diesem Falle wird der Erhitzungseffekt y_1 durch das Integral von T^p mal t bestimmt.

Dafür kann geschrieben werden:

$$y_1 = \left(\int_0^t T^p dt' \right)$$

Die Funktionsgleichung für die Reaktion 1 lautet daher analog der Funktionsgleichung der Reaktion 2:

$$y_1 = e^{-k_2^p \int_0^t T^p(t') dt'}$$

$$y_1 = e^{-k_2^p \int_0^t a^p t'^p dt'}$$

$$y_1 = e^{-\frac{k_2^p}{p+1} \cdot a^p \cdot t^{p+1}}$$

$$y_1 = e^{-k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot a^{-1} \cdot T_1^{p+1}}$$

Es soll $y_2 = y_1$ sein

$$k_2^p \cdot T_2^p \cdot t_2 = k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot a^{-1} \cdot T_1^{p+1}$$

$$k_2^p \cdot T_2^p = k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot 1/t_2 \cdot a \cdot T_1^{p+1}$$

und auch: $k_2^p \cdot T_2^p = k_1^{p+1} \cdot T_1^{p+1}$

Daraus folgt:

$$k_1^{p+1} \cdot T_1^{p+1} = k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot 1/t_2^a \cdot T_1^{p+1}$$

$$k_1^{p+1} \cdot k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot 1/t_2^a$$

Für $1/t_2^a$ kann auch geschrieben werden $t/t_2 T$.

$$k_1^{p+1} = k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot t/t_2 T$$

Wird $t_2 = 1$ gesetzt, was nach Voraussetzung der Reaktion 2 gegeben ist, ergibt sich:

$$k_1^{p+1} = k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot t/T$$

Diesen Ausdruck in die als Grundlage dienende Ausgangsgleichung (3) eingesetzt, ergibt folgende Formulierung:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^p \cdot 1/p+1 \cdot T^{p+1} \cdot t/T} \right] \quad (4)$$

Der Ansatz (4) formuliert den Reaktionsablauf einer Keimschädigung, bei der die Noxe (Temperatur) mit der Zeit linear ansteigt. Die Grundgleichung (3) wurde durch den Faktor $1/p + 1$, der die Reaktionskonstante k^p verändert und den Faktor t/T , der das Temperatur-Zeitverhältnis festlegt, erweitert.

Der Ansatz (4) läßt auch erkennen, daß der damit formulierte Reaktionsablauf, im doppeltlogarithmischen Baster dargestellt, einer geraden Linie mit der Steigung $\lg d = (p+1)$ entspricht.

Die Reaktionskonstante k hat in beiden Reaktionsabläufen (1 und 2) die gleiche Größe, sie kennzeichnet die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes zwischen Testorganismen-Population und Noxe, bezogen auf eine bestimmte Zeiteinheit.

Wird die Konstante k aus dem Reaktionsablauf 1, in dem die Temperatur mit der Zeit linear ansteigt, analog wie aus dem

Reaktionsablauf 2 ermittelt, so ist eine Umrechnung des k_1 -Wertes auf eine Zeiteinheit (z.B. Minuten oder Sekunden) erforderlich, da bei dieser Reaktion nur das Temperatur-Zeit-Verhältnis festliegt.

Es besteht die Beziehung (s.S. 53):

$$k_1^{p+1} = k_2^p \cdot 1/p+1 \cdot t/T$$

Für k_2 der Reaktion 2 (veränderliche Temperatur bei gleicher Einwirkungsdauer $t = 1$) wird in der allgemeinen Formulierung k gesetzt:

$$k_1^{p+1} = k^p \cdot 1/p+1 \cdot t/T$$

dividiert durch $1/p+1 \cdot t/T$ ergibt:

$$k^p = k_1^{p+1} \cdot (p+1) \cdot T/t$$

$$k = \left[k_1^{p+1} \cdot (p+1) \cdot T/t \right]^{1/p}$$

oder da $k = 1/d$ ist:

$$k = \left[(1/d_1)^{p+1} \cdot (p+1) \cdot T/t \right]^{1/p}$$

Für die Umrechnung auf eine andere Einheit der Zeit gilt folgender Ansatz:

$$k_{\text{sek}} = k_{\text{min}} / \sqrt[p]{60}$$

Die keim-schädigende Wirkung von Erhitzung und Heißhaltung

Laut Verordnung muß den Erhitzungsverfahren, die mit niedrigeren Temperaturen als die Hoherhitzung arbeiten, eine Heißhaltezeit angeschlossen werden. Daraus resultiert, daß der Kurzzeit- und der Dauererhitzung zwei unterschiedliche Reaktionsabläufe zugeordnet werden können. Einmal die Wirkung der Erhitzung nach dem Ansatz:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^P \cdot 1/p+1 \cdot T^{p+1} \cdot t/T} \right]$$

zum anderen die Wirkung der Heißhaltezeit nach dem Ansatz:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^P \cdot T^p \cdot t} \right]$$

Die bildliche Darstellung eines aus zwei Teilreaktionen zusammengesetzten Reaktionsablaufes ist aus Abb.11 ersichtlich.

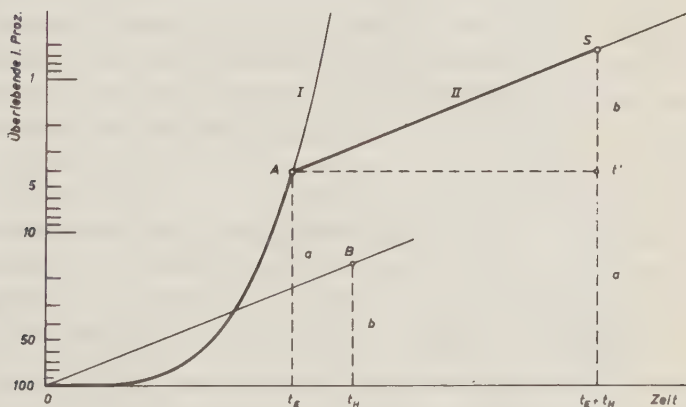


Abb.11: Schematische Darstellung der biologischen Wirkung einer Erhitzung mit anschließender Heißhaltung im halblogarithmischen Raster (n.FESSEN 1962)

Kurve I der Abb.11 stellt den Ablauf der Reaktion während der Erhitzung dar. Im Punkt A endet die Erhitzung, und die Heißhaltung beginnt, deren Reaktion durch Kurve II wiedergegeben ist. die Heißhaltung endet im Punkt S.

Es bestehen, wenn $N_0 = 1$ ist, folgende Beziehungen:

$$\lg N_0 = 0$$

$$a = (0 - \lg N_1)$$

$$b = (0 - \lg N_2)$$

$$a+b = (0 - \lg N)$$

$$= (0 - \lg N_1) + (0 - \lg N_2)$$

demnach ist:

$$\lg N = \lg N_1 + \lg N_2$$

$$N = N_1 \times N_2$$

da $N_+ = (1 - N)$ ist, ergibt sich

$$N_+ = (1 - N_1 \cdot N_2)$$

$$N_+/N_0 = (1 - N_1 \cdot N_2)$$

$$N_+ = N_0 \cdot (1 - N_1 \cdot N_2)$$

Für Punkt A gilt:

$$N_+/N_0 = \left[1 - e^{-k^p \cdot 1/p+1 \cdot t_E/T \cdot T^{(p+1)}} \right]$$

$$\text{durch } T \text{ gekürzt} = \left[1 - e^{-k^p \cdot 1/p+1 \cdot t_E \cdot T^p} \right]$$

Für Punkt B gilt:

$$N_+''/N_0 = (1 - e^{-k^p \cdot T^p \cdot t_H})$$

daraus folgt für Punkt S:

$$\begin{aligned} N_+/N_0 &= \left[1 - \left(e^{-k^p \cdot 1/p+1 \cdot t_E \cdot T^p} \right) \cdot \left(e^{-k^p \cdot T^p \cdot t_H} \right) \right] \\ &= \left[1 - e^{-k^p \cdot T^p \cdot (t_E/p+1 + t_H)} \right] \quad (5) \end{aligned}$$

Durch diesen Ansatz (5) ist der Effekt der Erhitzung mit anschließender Heißhaltung mathematisch beschrieben. Berechnungen müssen allerdings vom tatsächlichen Temperatur-Zeit-Verhältnis ausgehen. Der Effekt der Pasteurisierung in einem Milcherhitzer mit anschließender Heißhaltung kann aus den Daten der Durchflußzeit und der Austrittstemperatur alleine nicht befriedigend berechnet werden, da damit kein Einblick in den Erhitzungsablauf erhalten wird, der bestimmt ist durch den zeitlichen Verlauf des Temperaturanstieges und das Ausmaß der Heißhaltezeit. Der zeitliche Verlauf des Temperaturanstieges muß besonders berücksichtigt werden.

In der Praxis werden Milcherhitzer durch Vergleich mit einem "Normalerhitzer" geprüft. Beide Apparate werden mit der gleichen Milch gefahren, der eine Mikroorganismenreinkultur zugegeben wird. Aus der nach der Hitzeeinwirkung überlebenden Keimzahl, verglichen mit der Ausgangskeimzahl, wird der prozentuale Abtötungserfolg ermittelt. Ähnlich ist auch das Verfahren der biophysikalischen Analyse, sie ermöglicht es aber, den Wirkungsablauf statistisch zu erfassen und mathematisch zu erklären. Als Voraussetzung für biophysikalisches Arbeiten gilt, daß von einer einheitlichen, in ihrer Resistenz weitgehend homogenen, gleichartigen Bakterienpopulation ausgegangen werden muß.

Wie erwähnt, muß für Berechnungen auf biophysikalischer Grundlage die Temperatur-Zeit-Relation bekannt sein. In der Fachliteratur (PLOCK und WÄLZHOLZ, SCHULZ) werden darüber für die verschiedenen Erhitzungsverfahren entsprechende Angaben gemacht. In einer Hoherhitzungsanlage (85°C) mit einer Stundenleistung von 3 000 l wird der jeweilige Erhitzerinhalt = 12,1 l von einer Anfangstemperatur von z.B. 10°C in 14,5 Sekunden auf die Erhitzungstemperatur = 85°C erhitzt. Nach SCHULZ sind es 10-15 Sekunden ohne Berücksichtigung der Vorwärmung in den Austauschern. Legt man aber bei der Berechnung das reine Gegenstromprinzip zugrunde-Voraussetzung ist, daß der Wärmeaustausch bzw. die Erhitzung linear mit der Zeit erfolgt, - so ergibt sich für die Hoherhitzung eine Temperatur-Zeit-Relation, in der 85°C in 17 Sekunden erreicht werden.

Da die Konstanten k und p nur für den Fall gelten, daß die Erhitzung und somit die Schädigung der Mikroorganismen schon bei 0°C beginnt, muß die Durchlaufzeit eine Korrektur erfahren. So unwahrscheinlich diese Annahme erscheinen mag, so ist sie doch als Arbeitshypothese sehr zweckmäßig, da einerseits die wirkliche Anfangstemperatur für die Schädigung nicht erfaßt werden kann, andererseits der Wirkungsablauf auch auf 0°C als Anfangstemperatur für die Schädigung bezogen werden kann, ohne diesen dadurch formal zu entstellen.

Die Korrektur der Durchlaufzeit wird durch folgende Proportion erläutert:



Bekannte Größen sind: $(t - t')$ = tatsächliche Durchlaufzeit, T' = Temperatur der einlaufenden und T_E die Temperatur der aus dem Erhitzer auslaufenden Milch.

Gesucht ist der Wert für t , d.i. die Zeit, die der Erhitzung von 0°C auf T_E entsprechen würde.

Daraus folgt:

$$t : (t - t') = T_E : (T_E - T')$$

$$t = T_E (t - t') / (T_E - T')$$

Einer Einlaufstemperatur von 10°C und einer Erhitzung von 85°C in 17 Sekunden entspricht eine korrigierte Durchlaufzeit von 19,3 Sekunden. Wird, wie bei der Dauer- und Kurzzeiterhitzung die Auslauftemperatur kleiner, muß die korrigierte Durchlaufzeit größer werden.

Für die verschiedenen Erhitzungsverfahren ergeben sich, wenn

17 Sekunden tatsächliche Durchlaufzeit zugrundegelegt werden, folgende korrigierte Durchlaufzeiten:

Hoherhitzung:	von 0°C auf 85°C in 19,267 Sekunden
Kurzzeiterhitzung:	von 0°C auf $71,5^{\circ}\text{C}$ in 19,764 Sekunden
Dauererhitzung:	von 0°C auf 65°C in 20,091 Sekunden.

Bei den später folgenden Berechnungen wird von diesen korrigierten Werten ausgegangen.

Vergleichende Gegenüberstellung aller Erhitzungsverfahren in einem Diagramm

Anhand der Untersuchungsergebnisse von JANOSCHEK, FESSEN (1962), MANOLKIDIS (1961/1962), SCHULZ (1957) und dieser Arbeit kann unter Verwendung der beschriebenen Rechenverfahren ein Diagramm erstellt werden, in dem alle möglichen Erhitzungsverfahren vergleichend gegenübergestellt sind (Abb. 12).

In dem Diagramm ist auf der x-Achse der Logarithmus des Zeitintegrals $\log t_E/3t_H + t_H$ aufgetragen. Die y-Achse enthält den Logarithmus der Temperatur und die k-Werte, die durch schräge Linien dargestellt sind, hier nur durch kurze Striche angedeutet, entsprechend einer 99%igen Abtötung. Parallel dazu verlaufen unten in der Abbildung die Linien für die üblichen Pasteurisierungsverfahren. Oben im Bild verlaufen die Linien einiger Verfahren der Ultra-Hoherhitzung sowie eines Sterilisierverfahrens und die Linie für die 99%ige Abtötung der Sporen von *Bac. stearothermophilus*. Durch die kurzen schrägen Linien rechts wird angedeutet, in welchem Prozentsatz diese extrem resistenten Sporen durch unterschiedliche Hitzeeinwirkung abgetötet werden.

Die steil verlaufenden Linien geben Aufschluß über die Ausfällung des Albumins (1-99%) und die Inaktivierung der alkalischen und sauren Phosphatase (99,99%). Der Neigungswinkel wird durch den Wert p bestimmt, der für das Lactalbumin $p = 5,65$ beträgt und für Enzyme Werte von $p = 5,15$ bis $p = 28,0$ haben kann.

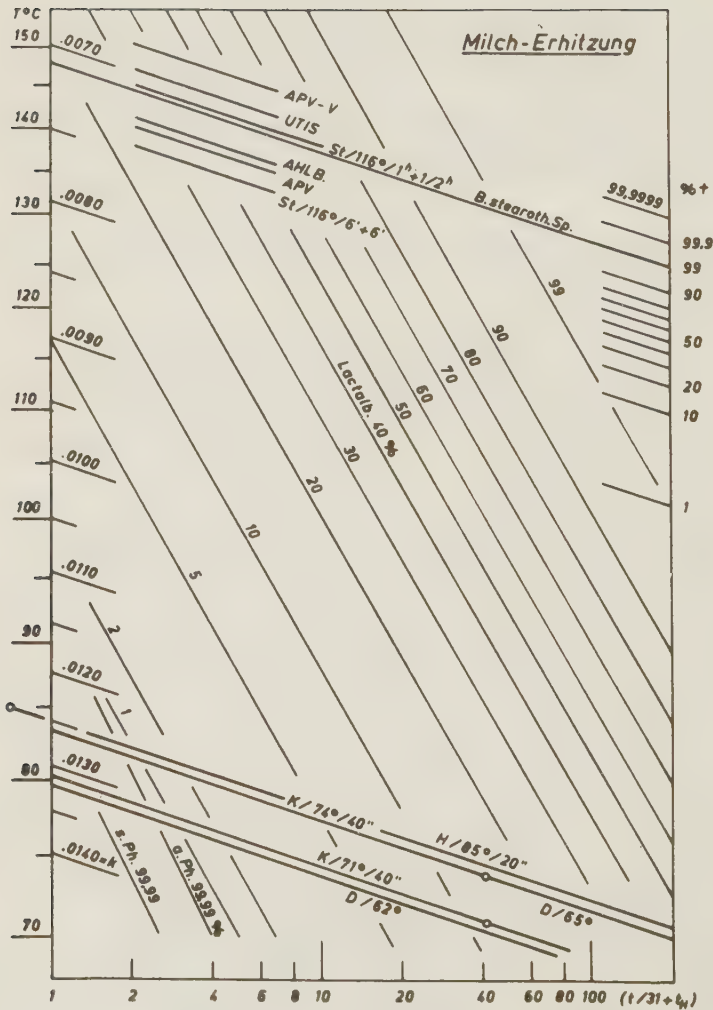


Abb.12: Die Temperatur-Zeit-Korrelation und ihre Auswirkung bei Milch
(n.JANOSCHEK: Molkerei-und Käserei Zeitung 40,1496 (1965)).

Aus der Darstellung ist ersichtlich, daß eine Ultrahocherhitzung auf 150°C in 31 Sekunden, entsprechend dem Wert 1 für das Zeitintegral ($31/p+1=1$), das Albumin nicht wesentlich stärker schädigt als die Kurzzeiterhitzung.

Daraus ist die Schlußfolgerung zu ziehen: möglichst rasch und hoch erhitzen und auf Haltezeit soweit wie möglich zu verzichten, um einen hohen keimabtötenden Effekt und eine geringe Schädigung des Eiweißes zu erzielen.

2. Testorganismen, Milieu und Methodik

Als Testorganismen wurden folgende 3 Arten, die aus der Milch isoliert wurden, verwendet:

Micrococcus varians, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus thermophilus* (118) und aus der Institutssammlung *Streptococcus thermophilus* (Weißenstephan).

Zur Gewinnung einheitlichen Keimmaterials wurden alle Kulturen in der bereits genannten Hefe-Glukose-Laktose-Extrakt-Bouillon (NAGUIB 1961) vorgezüchtet. Die Milchsäurebakterien erreichten ihre maximalen Keimzahlen bereits nach 12 stündiger und *Micrococcus varians* nach 36 stündiger Bebrütung bei Optimaltemperatur. Nach der Bebrütung wurden die Kulturen zentrifugiert, mit sterilem Leitungswasser gewaschen und aufgeschwemmt. Die Keimsuspension wurde so eingestellt, daß sich im Reaktionsgemisch 12- 14 Mill. Keime bzw. Zellverbände pro ml befanden. Eine Auftrennung der besonders bei *Micrococcus varians* sehr großen Zellverbände durch Schütteln mit sterilen Glasperlen zwecks Bestimmung der mittleren Zellenzahl pro Wuchsverband (m-Wert) führte zu recht unterschiedlichen Ergebnissen. Deshalb wurden die m- und k-Werte über Zeitversuche ermittelt. Die Konstante p als Ausdruck für die spezifische Reaktionsart der Noxe kann nur aus einer Dosiskurve abgeleitet werden. Bei allen Versuchen von FESSEN (1962), in denen verschiedene Organismen verschiedenen Temperaturen ausgesetzt waren, zeigte sich, daß der p-Wert

für Hitze nur geringen Schwankungen unterliegt. FESSEN hat für die Noxe Hitze immer einen p-Wert von 29-30 gefunden, was auch den übrigen Untersuchungen am hiesigen Institut entspricht, da für verschiedene Organismen gegenüber der gleichen Noxe immer derselbe p-Wert gefunden wurde (ELSHOLZ 1956). Dieses Ergebnis untermauert auch die bekannte Tatsache, daß Hitze eine sehr gute desinfizierende Wirkung hat, vor allem deshalb, weil einem kleinen Temperaturbereich eine durchgreifende Wirkung zukommt. Die große Versuchszahl, die immer den gleichen p-Wert ergab, unterstützt die von JANOSCHEK vertretene Meinung, daß der p-Wert ein Maß für das Wechselspiel zwischen der Zelle und der einwirkenden Noxe ist und den spezifischen Wirkungsmechanismus der Noxe charakterisiert.

Als Testmilieu für die Abtötungsversuche wurde sterilisierte Milch verwendet, um nicht durch den Keimgehalt unterschiedlicher Resistenz einer Rohmilch Fehler zu verursachen. FESSEN konnte nachweisen, daß die Schutzwirkung der Rohmilch gegenüber der physikalischen Noxe Hitze relativ gering ist. Anders verhält sich dagegen die Schutzwirkung der Milch, insbesondere der Rohmilch, für Mikroorganismen gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln (SCHMIDT 1958).

Durch den Zeitversuch wird ein Reaktionsablauf statistisch erfaßt, bei dem Organismen einer konstanten Noxenkonzentration, hier Hitze, zeitabhängig ausgesetzt werden. Als Merkmal einer stattgefundenen Reaktion dient der Verlust der Vermehrungsfähigkeit.

In ein 100 ml Erlenmeyerkölbchen wurden 50 ml sterilisierte Milch pipettiert. Das Kölbchen wurde, beschwert durch einen Bleiring, in das Wasserbad eines Ultrathermostaten Typ NB so gestellt, daß die Milchoberfläche sich unter der Wasseroberfläche befand. War die Reaktionstemperatur erreicht, wurde 1 ml der kurz zuvor hergestellten Keimsuspension unter Schwenken des Kölbchens hinzugegeben. In bestimmten Zeitabständen

wurden unter regelmässigem Bewegen des Reaktionsgemisches Proben entnommen, die sofort, um eine Nachwirkung der Temperatur zu verhindern, in Verdünnungsflaschen pipettiert wurden.

Das Zählen der nicht reagierten Zellen erfolgte mit der KOCH'schen Plattenmethode unter Verwendung von Hefe-Glukose-Laktose-Extrakt-Agar nach Bebrütung bei Optimaltemperatur bis zur maximalen Koloniengröße.

Der Anteil der reagierten Einheiten (N_+) ergibt sich jeweils aus der Differenz der zu Beginn der Reaktion vorhandenen reaktionsfähigen Einheiten (N_0) zu den zum Zeitpunkt der Probeentnahme nicht reagierten Einheiten (N).

Die Ermittlung der Anzahl der zu Beginn der Reaktion reaktionsfähigen Zellen bzw. Zellverbände erfolgt gewöhnlich in einem Parallelkölbchen, das die gleiche Flüssigkeits- und Keimsuspensionsmenge enthält, bei Zimmertemperatur. Es stellte sich aber heraus, daß die Keimzahl der ersten Probeentnahme aus dem Reaktionskölbchen oft höher war als die des Kontrollwertes infolge einer Zerteilung der Zellverbände beim Einpipettieren in die heiße Milch. Um diesen Unterschied zu beseitigen, wurde der Inhalt des Kontrollwertkölbchens vor Einpipettieren der Keimsuspension auf eine Temperatur von 60°C erwärmt, die für die kurze Verweildauer bis zur Verteilung der Keimsuspension nicht abtötend wirkt.

FESSEN errechnete die Abtötung einer Modellkeimpopulation mit geringerer Hitzeresistenz ($k = 0,01287$) als die in dieser Arbeit getesteten Organismen bei der Erhitzung auf 65°C in 20 Sekunden auf $N_+ = 0,3067\%$.

Die Abbildungen 13 - 18 zeigen die Zeitkurven der getesteten Organismenarten.

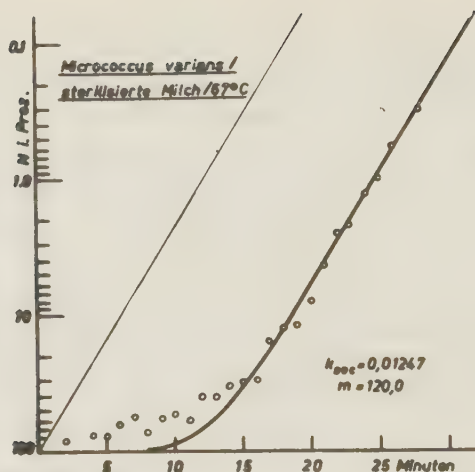


Abb.13: Der Hitzetod von *Micrococcus varians* in sterilisierter Milch in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur (67°C), dargestellt im halblogarithmischen Raster ($m = 120,0$).

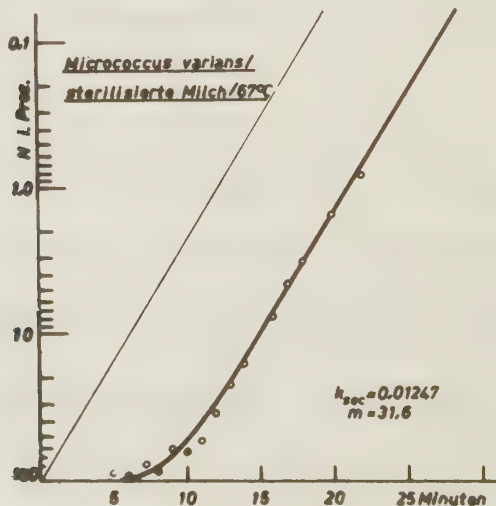


Abb.14: Der Hitzetod von *Micrococcus varians* in sterilisierter Milch in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur (67°C), dargestellt im halblogarithmischen Raster ($m = 31,6$).

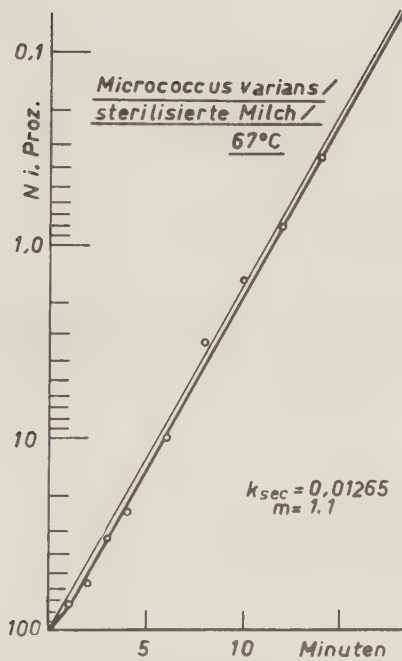


Abb.15: Der Hitzetod von *Micrococcus varians* in sterilisierter Milch in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur (67°C), dargestellt im halblogarithmischen Baster ($m = 1,1$).

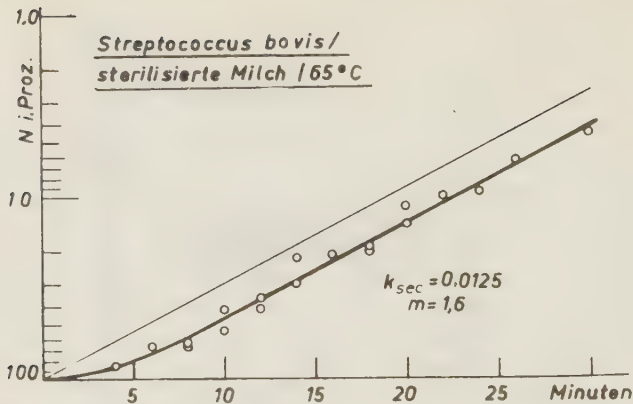


Abb.16: Der Hitzetod von Streptococcus bovis in sterilisierter Milch in Abhängigkeit der Einwirkungs-dauer einer bestimmten Temperatur (65°C), dargestellt im halblogarithmischen Raster.

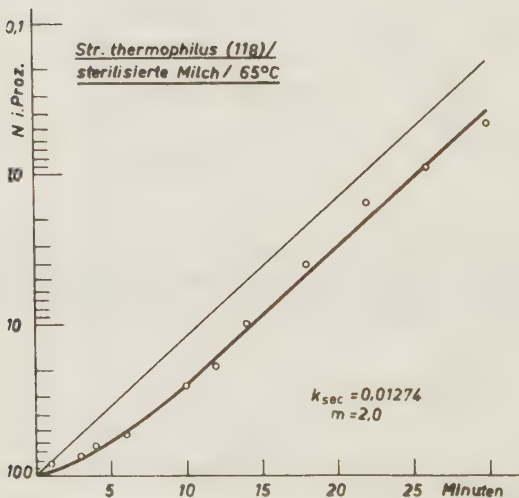


Abb.17: Der Hitzetod von Streptococcus thermophilus (118) in sterilisierter Milch in Abhängigkeit der Einwirkungs-dauer einer bestimmten Temperatur (65°C), dargestellt im halblogarithmischen Raster.

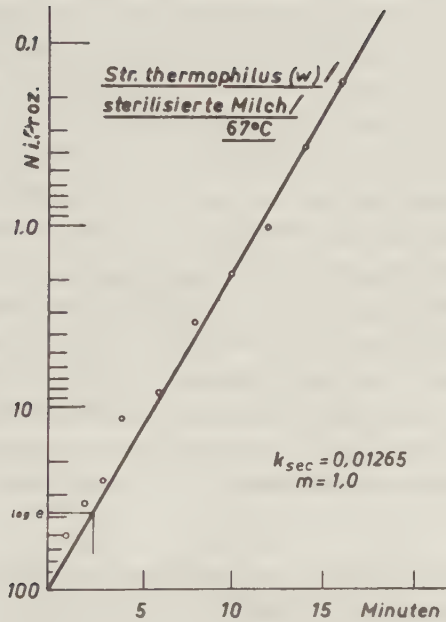


Abb. 18: Der Hitzetod von *Streptococcus thermophilus* (Weihenstephan) in sterilisierter Milch in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur (67°C), dargestellt im halblogarithmischen Raster.

Wie bereits vorher beschrieben, wird zu dem asymptotisch verlaufenden Teil der Kurve eine Parallele durch den Nullpunkt gelegt. Diese Gerade durch den Nullpunkt entspricht einem Reaktionsablauf für den Wert $m = 1$. Der senkrechte Abstand der Parallele zu dem geraden Abschnitt der Versuchskurve ergibt delogarithmiert den wirklichen Wert für m . Die Krümmung der Zeitkurven, d.h. ihr Verlauf, wurde aus verschiedenen Werten für $y = 2 - \log N$ der durch den Nullpunkt gehenden Geraden ($m = 1$) errechnet, indem der Wert für $y = 2 - \log N$ mit dem wirklichen m -Wert potenziert wurde ($y = [2 - \log N]^m$).

Die eingezeichneten Versuchspunkte stellen den statistisch erfaßten Reaktionsablauf dar.

Der Wert k , ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion abläuft, somit auch ein Maß für die Resistenz der Organismen, wurde aus der durch den Nullpunkt gehenden Geraden in Abhängigkeit des Ordinatenwertes $\log e$ (Abb.8), dem reziproken Wert jener Zeit ($k_t = 1/t$), in der 63,212 % der vorhandenen reaktionsfähigen Einheiten bei einer konstanten Dosis (D) reagiert haben, ermittelt

$$k = \frac{p}{\sqrt{k_t}} / D$$

Die angegebenen k -Werte beziehen sich auf die Zeiteinheit Sekunden, da auch die Zeitangaben bei den Erhitzungsverfahren in Sekunden erfolgen.

Die Abbildungen 13 - 15 zeigen Reaktionsabläufe desselben Organismus (*Micrococcus varians*) für verschiedene m -Werte, die durch Schütteln der Keimsuspension mit sterilen Glasperlen erhalten wurden. Trotz unterschiedlichen Verlaufes der statistisch erfaßten Reaktionsabläufe liegt allen Reaktionen annähernd der gleiche k -Wert zugrunde. Aus diesem Beispiel ist deutlich zu ersehen, daß Schlußfolgerungen über die Resistenz eines Organismus, gezogen nur aus dem statistisch erfaßten Reaktionsablauf, der keinem Eintreffergeschehen folgt ($m > 1$), nicht möglich sind. Dadurch wird eine viel höhere Resistenz vorgetauscht. Diesem Fehler unterlagen die Ergebnisse von REICHENBACH (1911).

Daß die Bildung von Zellverbänden bei Mikrokokken mit einer mittleren Zellenzahl von $m = 120$ (Abb.12) möglich ist, konnte auch annähernd aus der mikroskopischen Bestimmung des m -Wertes entnommen werden.

Im Lebendpräparat einer genau abgemessenen Menge Keimsuspension wurde die mittlere Anzahl der Zellverbände pro Gesichtsfeld ermittelt. Anschließend wurde die Keimsuspension, aus der das Präparat angefertigt worden war, mit sterilen Glasperlen 30 Minuten lang kräftig geschüttelt, danach um ein mehrfaches mit sterilem Wasser verdünnt und wiederum ein Präparat mit der gleichen Menge angefertigt. Nun waren die Zellverbände derart zerkleinert, daß sich ihre mittlere Zellenzahl annähernd durch Auszählen ermitteln ließ. Die mittlere Zellenzahl des zweiten Präparates wurde multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor; das Produkt dividiert durch die Anzahl der Zellverbände des ersten Präparates ergab ihre mittlere Zellenzahl.

Aus den k -Werten der Abbildungen 17 -18 ist zu ersehen, daß verschiedene Stämme einer Art unterschiedliche Resistenz besitzen können.

3. Berechnung der Temperatur für das Kurzzeiterhitzungsverfahren für einen bestimmten Abtötungserfolg bei einer einheitlichen Bakterienpopulation

Die Wirkung der Kurzzeiterhitzung resultiert aus den Reaktionsabläufen der Erhitzung und der sich anschließenden Heißhaltung, sie folgt dem oben erläuterten Ansatz (5) :

$$N_+ = N_o \cdot \left[1 - e^{-k^D \cdot T^D \cdot (t_E/p+1 + t_H)} \right]$$

Der Prozentsatz der abgetöteten Organismen (N_+) ist abhängig von dem Wert k , der Resistenz einer Organismenart; er ändert sich mit unterschiedlichem k .

Soll nun aber der Prozentsatz der abgetöteten Organismen für

verschiedene Arten mit unterschiedlicher Resistenz gleich bleiben z.B. 99,99%, so kann dies bei der Kurzzeiterhitzung durch Änderung einer der beiden Größen des Integrals aus Temperatur mal Zeit erreicht werden. Es ist einfacher, die Temperatur (T) zu ändern, als die Durchlaufzeit (t), die durch die Druckverhältnisse in Abhängigkeit von Milchpumpe und Zentrifuge bestimmt wird. Ausgehend von Ansatz (5) ergibt sich:

$$N_+/N_0 - 1 = - e^{-(k \cdot T)^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)}$$

Änderung der Vorzeichen ergibt:

$$1 - N_+/N_0 = e^{-(k \cdot T)^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)}$$

Hierfür kann auch geschrieben werden:

$$(N_0 - N_+)/N_0 = e^{-(k \cdot T)^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)}$$

oder da $N_0 - N_+ = N$ ist:

$$N/N_0 = e^{-(k \cdot T)^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)}$$

Da $N_0 = 100$ und $\log 100 = 2$ ist, gilt nach Logarithmierung:

$$\lg N = 2 = - \log e \cdot (k \cdot T)^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)$$

Eine Änderung der Vorzeichen ergibt den Ausdruck:

$$2 - \log N = \log e \cdot (k \cdot T)^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)$$

Dividiert durch $\log e \cdot (t_E/p+1 + t_H)$ ergibt:

$$(k \cdot T)^P = \frac{2 - \log N}{\log e \cdot (t_E/p+1 + t_H)}$$

nach Logarithmierung:

$$p \cdot \log (k.T) = \log [2 - \log N] - \log [\log e \cdot (t_E/p + 1 + t_H)]$$

$$\log (k.T) = \frac{\log [2 - \log N] - \log [\log e \cdot (t_E/p + 1 + t_H)]}{p}$$

Nach Delogarithmierung ergibt der rechte Ausdruck der Gleichung den Wert $k \cdot T$, diesen durch k dividiert ergibt die Temperatur T .

Dem folgenden Rechenbeispiel für das Kurzzeiterhitzungsverfahren soll eine 99,99%ige Abtötung und ein Wert für $k = 0,01247$ (*Micrococcus varians*) zugrunde gelegt werden. Wie hoch muß die Erhitzungstemperatur sein?

Bekannte Größen sind:

$N_+ = 99,99 \%$	$t_E = 19,7642''$
$N = 0,01 \%$	$t_H = 40,0''$
$\lg N = 0,0000 - 2$	$p = 30,0$
$2 - \lg N = 4$	$k_{\text{sec}} = 0,01247$
$\lg(2 - \lg N) = 0,60206$	
Berechnung des Ausdruckes:	$\log e (t_E/p + 1 + t_H)$

$(t_E/p + 1 + t_H) :$

$\lg t_E$	$= 1,29588$
$- \lg(p+1)$	$= 1,49136$
	$0,80452 - 1$
$t_E/p + 1$	$= 0,63756$
$+ t_H$	$= 40,0$
$t_E/p + 1 + t_H$	$= 40,63756$
$\lg (t_E/p + 1 + t_H)$	$= 1,60891$
$+ \lg \lg e$	$= 0,63779 - 1$
	$= 1,24670$

$$\begin{aligned}
 \lg (2 - \lg N) &= 0,60206 \\
 - \lg [\lg e (t_E/p+1+t_H)] &= 1,24670 \\
 \hline
 &= 0,35536 - 1 + 30 \\
 &\quad (29,35536 - 30) : 30 \\
 \lg 29,35536 &= 1,46768 \\
 - \lg 30 &= 1,47712 \\
 \hline
 &= 0,99056 - 1 \\
 29,35536 : 30 &= 0,9785 \\
 - 30 : 30 &= 1,0 \\
 \hline
 \lg (k.T) &= 0,9785 - 1 \\
 k.T &= 0,9517 \\
 T &= 0,9517 : 0,01247 \\
 \lg 0,9517 &= 0,97850 - 1 \\
 - \lg 0,01247 &= 0,09587 - 2 \\
 \hline
 &= 1,88263 \\
 T &= 76,3^\circ \text{C} \\
 &=====
 \end{aligned}$$

In Tabelle 7 sind die erforderlichen Temperaturen aller getesteten Organismen für einen Abtötungseffekt von 99,99 % durch die Kurzzeiterhitzung ersichtlich, ausserdem der Abtötungseffekt bei einer Temperatur von $T = 74^\circ\text{C}$ und 76°C . Zum Vergleich wurde noch der k-Wert für die Sporen von *Bac.stearothermophilus* hinzugenommen, er beträgt 0,0071, ist also am kleinsten, was der höchsten Resistenz gegenüber hohen Temperaturen entspricht.

Tabelle 7:

	k_{sec}	$T^\circ\text{C}$ $b.N_+ = 99,99\%$	$N_+ \%$ $b.T = 74^\circ\text{C} b.T = 76^\circ\text{C}$	$N_+ \%$ $b.T = 76^\circ\text{C}$
<i>Micrococcus varians</i>	0,01247	76,3	97,522	99,973
<i>Streptococcus bovis</i>	0,0125	76,1	98,013	99,983
<i>Str.thermophilus</i> (w)	0,01265	75,2	99,633	99,9996
<i>Str.thermophilus</i> (118)	0,01274	74,7	99,82	99,9999
<i>Bac.stearothermophilus</i> Sporen	0,0071	134,0	0,00	0,00

Die gleichen Voraussetzungen des Rechengangs gelten für jedes beliebige Erhitzungsverfahren mit Heißhaltezeit. Bei einer Erhitzung ohne Heißhaltezeit muß von dem folgenden Ansatz ausgegangen werden:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^P \cdot (1/p+1) \cdot t_E \cdot T^P} \right] \quad (6)$$

4. Ermittlung der Temperatur beim Übergang zu einem anderen Erhitzungsverfahren bei gleichbleibendem Abtötungseffekt

In dem Ansatz (6), der den Reaktionsablauf einer Erhitzung beschreibt, wobei die Temperatur mit der Zeit gleichsinnig und linear ansteigt, wird die Wirkung bestimmt durch das Integral aus $T^P \cdot t \cdot 1/p+1$. Wird noch zusätzlich eine Heißhaltung angeschlossen, erweitert sich das Integral um den Wert t_H (Ansatz (5)). Demnach ändert sich beim Wechsel von einer Erhitzungsart zu einer anderen nur das Integral aus Temperatur mal Zeit. Solange aber, auch bei Änderung einer der Größen T oder t, das Integral in seiner Gesamtheit gleich bleibt, bleibt auch der Abtötungseffekt der gleiche.

Daraus ergibt sich für die Umrechnung von der Kurzzeit- und Dauererhitzung zur Hoherhitzung:

$$\underset{a}{T^P \cdot (t_E/p+1 + t_H)} = \underset{b}{T^P \cdot (t_E \cdot 1/p+1)}$$

Ein Rechenbeispiel soll die Umrechnung der Kurzzeiterhitzung, wobei $T = 74^\circ\text{C}$ sein soll, zur Hoherhitzung zeigen. Gesucht wird die Temperatur der Hoherhitzung. Alle anderen Größen behalten die zuvor beschriebenen Werte.

Kurzzeiterhitzung

$$\begin{aligned} T &= 74^\circ\text{C} \\ t_E &= 19,764 \text{ " } \\ t_H &= 40,0 \text{ " } \\ p &= 30,0 \end{aligned}$$

Hoherhitzung

$$\begin{aligned} T &= x^\circ\text{C} \\ t_E &= 19,267 \text{ " } \\ t_H &= 0,0 \text{ " } \\ p &= 30,0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{a)} \quad \lg 74 &= \frac{1,86923 \cdot 30}{56,07690} \\
 + \lg(t_E/p+1+t_H) &= 1,60892 \quad (\text{s.S. 71}) \\
 \lg [T^p(t_E/p+1+t_H)] &= 57,68582
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b)} \quad \lg t_E (19,267) &= 1,28481 \\
 + \lg (1/p+1) &= 0,50864 - 2 \\
 \lg(t_E \cdot 1/p+1) &= 0,79345 - 1 \\
 57,68582 &= \lg T \cdot 30 + 0,79345 - 1 \\
 \lg T &= \frac{57,68582 - (0,79345 - 1)}{30} \\
 \lg T &= 57,89237 : 30 \\
 \lg 57,89237 &= 1,76262 \\
 - \lg 30 &= 1,47712 \\
 &= 0,28550 \\
 \lg T &= 1,9297 \\
 T &= 85,0^\circ\text{C}
 \end{aligned}$$

Der Abtötungseffekt einer Kurzzeiterhitzung, wobei die Erhitzungstemperatur $T = 74^\circ\text{C}$ und die Durchlaufzeit $t_E = 19,76''$ + $t_H = 40''$ beträgt, kann auch erreicht werden durch eine Erhitzung auf 85°C in $19,26''$ ohne Heißhaltung (Hocherhitzung).

Tabelle 8 zeigt die Temperaturen der verschiedenen Erhitzungsverfahren, die dem gleichen Integral aus Temperatur mal Zeit entsprechen, somit gleichem keimabtötenden Effekt.

Tabelle 8:	T	T	t_E	t_H
Kurzzeiterhitzung	74°C	76°C	$19,7642''$	$40''$
Hocherhitzung	85°C	$87,4^\circ\text{C}$	$19,2678''$	$0''$
Dauererhitzung	$65,2^\circ\text{C}$	$66,3^\circ\text{C}$	$20,0909''$	$1800''$

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß die mathematischen Formulierungen der Hitzewirkung und die Rechenbeispiele von der Annahme ausgingen, daß die Temperatur mit der Zeit gleichsinnig und linear ansteigt. Abweichungen vom linearen Temperaturanstieg bedingen Änderungen im Reaktionsablauf, die sich auch auf den biologischen Effekt auswirken. Allein aus den physikalischen Kennziffern der Durchlaufzeit und der Austrittstemperatur eines Milcherhitzers lassen sich Abweichungen vom linearen Temperaturanstieg nicht entnehmen, sie können aber durch exakte Messungen in verschiedenen Abschnitten eines Erhitzers ermittelt werden.

V. D i s k u s s i o n:

In der vorliegenden Arbeit sollten die Ursachen der Entstehung der Kleinkolonien bildenden Organismen (PPK), sowie deren Klassifizierung und die Kinetik ihrer Abtötung durch das Pasteurisieren bearbeitet werden.

Das häufige und oft unerklärlich sprunghafte Auftreten von PPK bei der bakteriologischen Untersuchung der Milch bringt in ihre qualitative Beurteilung eine gewisse Unsicherheit. Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß vielerlei Ursachen an der Entstehung von Kleinkolonien beteiligt sein können.

Der wohl entscheidendste Faktor ist bei der Keimzählung in der Nährbodenzusammensetzung zu suchen, wobei der Zuckergehalt die größte Rolle spielt. Viele Milchsäurebakterien und andere Saprophyten benötigen für ein gutes Wachstum auf künstlichem Nährboden eine Zuckerkonzentration von über 0,003 %.

Durch Verwendung eines zuckerfreien Nährbodens bei der Keimzahlbestimmung in Trinkmilch sollte das Auftreten der störenden PPK und eine Benachteiligung der kurzzeiterhitzten Milch mit ihren vielen überlebenden Keimen (infolge hoher Resistenz verschiedener Organismenarten) gegenüber der hocheerhitzten Milch verhindert werden. Ein weiterer Vorteil sollte die in vielen Fällen geringere Zahl der Keime sein, die man auf dem zuckerlosen Nährboden fand. Aber verschiedene Milchsäurebakterien können auch ohne Gegenwart vergärbare Kohlenhydrate Kolonien bilden, die dann erst recht als PPK auftreten. Schwankungen der Keimzahl auf zuckerfreiem Nährboden werden auch verursacht durch denjenigen Zucker, der bei niedrigen Verdünnungen mit der Milch in den Nährboden gelangt.

Einen weiteren Einfluß auf die Entstehung von PPK übt die Bebrütungsdauer aus. Bei einer Bebrütungsdauer von 48 Stunden bei 30°C erreicht vor allem die Gruppe der thermophilen Organismen nicht ihre optimale Koloniengröße, ebenso kann bei längerer Bebrütung die Keimzahl um ein Mehrfaches ansteigen.

Es hat sich gezeigt, daß durch Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln und antibiotischen Stoffen bei der Milchgewinnung die Flora der Milch sehr einseitig werden kann, und

dadurch die Reduktionsprobe an Aussagewert verliert. Schon aus diesem Grunde kann auf die Keimzählung nicht verzichtet werden, zumal sich alle milchwirtschaftlich führenden Länder bei der bakteriologischen Untersuchung der Anlieferungsmilch immer umfangreicher der Keimzahlbestimmung bedienen, da sie durch kein anderes Verfahren zu ersetzen ist. Somit erübrigt sich eine weitere Diskussion über die Frage, welcher Nährboden der geeignetste ist. Als günstigster Nährboden für die Keimzahlbestimmung ist der anzusehen, auf dem in einer bestimmten Zeit und bei einer bestimmten Temperatur die meisten Keime aller Arten, die für das Untersuchungsprodukt typisch sind, anwachsen. Auch um den tatsächlichen Abtötungseffekt eines Erhitzungsverfahrens genau ermitteln zu können, ist ein für alle in der Milch vorkommenden Mikroorganismen optimaler Nährboden wünschenswert.

Eine Verringerung der Aktivität der die Pasteurisierung überlebenden Keime infolge einer Hitzeschädigung bestätigte sich nicht. Es konnte lediglich die Beobachtung gemacht werden, daß die Kolonien von Organismen, die zur Bildung großer Zellverbände neigen, wie z.B. die Mikrokokken, nach Hitzeeinwirkung langsamer wachsen, aber nicht als Folge einer Zellschädigung, sondern weil der überwiegende Teil der Zellen eines Verbandes abgetötet wird, und dadurch die Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien gegenüber der Kolonie eines unerhitzten Zellverbandes langsamer ist. Der Größenunterschied der Kolonien gleicht sich bei längerer Bebrütung aus.

Eine Trennung in nützliche und schädliche Keime ist irreführend, solange die Haltbarkeit der Milch im Vordergrund steht. Sie bietet lediglich Anhaltspunkte über die hygienischen Verhältnisse bei der Gewinnung der Milch. Wenn auch die thermoresistenten Saprophyten, die bei den eigenen Untersuchungen zu 67% an den PPK in pasteurisierter Milch beteiligt waren, die Haltbarkeit der Milch durch ihr geringes Säuerungsvermögen nur langsam beeinflussen, so kommt es doch zur Bildung von Stoffwechselprodukten und Wirkstoffen, die die Bekömmlichkeit und den Wert der Milch als Nahrungsmittel beeinträchtigen.

Für die Erzielung einer hygienisch einwandfreien und haltbaren Milch ist letzten Endes nicht entscheidend, welcher Nährboden zur Keimzahlbestimmung verwendet wird, sondern entscheidend sind die hygienischen Verhältnisse bei der Gewinnung und entsprechende Erhitzungsverfahren bei der Entkeimung der Milch, die eine möglichst weitgehende Abtötung aller in ihr enthaltenen Keime ermöglichen. Der Entkeimung durch Pasteurisation sind aber Grenzen gesetzt, da der Rohmilchcharakter erhalten bleiben soll. Ausserdem kann das Ergebnis der Pasteurisation von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Es ist daher angebracht, den Vorgang der Entkeimung von Milch in allen Einzelheiten seines Ablaufs und den Einfluß der verschiedenen Faktoren zu studieren. Einen Einblick in das Geschehen der Pasteurisation liefert die Biophysik. Sie ermöglicht es, die biologischen Abläufe bis in die Elemente der belebten Welt zu verfolgen. Mit ihr kann der Zelltod als Reaktion mit der Umwelt in seinem Ablauf mathematisch beschrieben und erklärt werden. Die Biophysik bedient sich dabei der Statistik.

Der Hitzetod einer Bakterienpopulation wird als ein Geschehen betrachtet, das - wie jede chemische Reaktion - einen streng gesetzmäßigen Ablauf zeigt und vor allem von der Bakterienart bzw. deren Resistenz, der Temperatur, der Einwirkungsdauer und vom Medium abhängig ist. Der gesetzmäßige Ablauf des Geschehens kann durch folgende Gleichung erfaßt werden:

$$N_+ = N_0 \left[1 - e^{-(k.T)^p \cdot t} \right]^m$$

N_+ gibt die Zahl der durch die Temperatur T nach der Zeit t abgetöteten und N_0 die Zahl der ursprünglich vorhandenen lebensfähigen Keime an.

Der Wert k ist eine Geschwindigkeitskonstante des Absterbevorgangs, er ist ein Maß für die Resistenz der Keime in einem bestimmten Medium. Der Wert p ist ein Maß für den potentiellen Anstieg der Temperaturkurve. Er gibt den Widerstand an, den die Organismen der einwirkenden Noxe, hier der Temperatur, entgegenstellen und charakterisiert damit die Noxe. Er erreicht bei Hitze

einen Wert von 30. Die Potenz m gibt den bzw. die Treffbereiche eines Organismus an, die mindestens einmal reagieren müssen, damit eine Reaktion eintritt.

Die Gleichung hat für alle Organismen, für alle Noxen, also für jede Temperatur und jede Einwirkungsdauer volle Gültigkeit. Nur die Konstante k ist von der Organismenart und von der Art der Noxe abhängig.

Wird die biologische Wirkung der Erhitzung an einem Erhitzergerät im praktischen Betrieb studiert, bleiben verschiedene Faktoren unberücksichtigt, so daß man nicht zu vergleichbaren Ergebnissen gelangen kann.

Demgegenüber gestattet die biophysikalische Analyse der Abtötung störende Faktoren auszuschalten oder ihren Einfluß zu berücksichtigen. Es kann der Einfluß der Zeit, der Temperatur und des Milieus einzeln in seiner Gesetzmäßigkeit erfaßt und die Summenwirkung ermittelt werden.

Legt man dem Pasteurisierungsvorgang die Annahme zugrunde, daß die Erhitzung im Wärmeaustauscher mit der Zeit gleichsinnig und linear erfolgt, festgelegt durch ein bestimmtes Verhältnis von Temperatur und Zeit, so kann mit Hilfe des Reaktionskinetischen Grundgesetzes folgender Ansatz erstellt werden, der die Wirkung und den Effekt der Pasteurisierung formuliert:

$$N_+ = N_0 \cdot \left[1 - e^{-k^p \cdot \frac{1}{p+1} \cdot T^{p+1} \cdot t_E/T} \right]$$

In dieser Funktionsgleichung ist dem Wert k^p der Faktor $1/p+1$ zugeordnet. Es ist verständlich, daß der Effekt kleiner ist, wenn die Temperatur erst mit der Zeit erreicht wird, als wenn eine konstante Temperatur eine bestimmte Zeit einwirkt. Durch den Exponenten für T , der $p+1$ ist, wird der potentielle Anstieg der Wirkung verstärkt.

Der Ausdruck t/T gibt das Temperatur-Zeit-Verhältnis an.

Der beschriebene Reaktionsablauf entspricht dem Vorgang der Erhitzung. Wird der Erhitzung eine Heißhaltezeit angeschlossen, so ist deren Wirkung als ein gesonderter Reaktionsablauf zu betrachten. Beide Reaktionsabläufe können in einer Funktionsgleichung zusammengefaßt werden:

$$N_+ = N_o \left[1 - e^{-k^P \cdot T^P \cdot (t_E/(p+1) + t_H)} \right]$$

Da der Erhitzungseffekt durch das Integral von Temperatur mal Zeit bestimmt wird, kann einer dieser beiden integrierenden Faktoren auf Kosten des anderen verändert werden.

Die obige Funktionsgleichung ermöglicht es, den Effekt der verschiedenen Pasteurisierungsverfahren zu berechnen und miteinander zu vergleichen sowie auch die Erhitzungstemperatur eines Verfahrens für einen gewünschten Effekt zu errechnen.

Welche Wirkung ist nun zu erwarten, wenn- wie bei der Anlieferungsmilch üblich- eine Mischflora mit verschiedener Resistenz vorliegt. Setzt man Keimarten mit unterschiedlicher Resistenz einer Hitzebehandlung aus, dann werden alle Keime gleicher Resistenz nach der oben formulierten Gleichung jeweils unabhängig von anderen Keimgruppen abgetötet, und die Gesamtwirkung entspricht der Summe der Einzelwirkungen. Der Effekt eines Entkeimungsverfahrens wird von den resistenten Keimen bestimmt. Um einen hohen Effekt zu erzielen, hat sich das Temperaturzeitverhältnis bei der Entkeimung nach der Resistenz der dominierenden Keimart innerhalb der resistenten Arten zu richten, wobei es einfacher ist, die Temperatur zu ändern als die Durchlaufzeit, die durch Milchpumpe und Zentrifuge, also durch deren Leistung, festgelegt ist.

Die Resistenz von Keimarten kann durch biophysikalische Analyse über wenig aufwendige, statistisch angelegte Laborversuche ermittelt werden. Wenn die physikalische Wirkung eines Erhitzers bekannt ist, worunter der zeitliche Ablauf des Temperaturanstieges gemeint ist und nicht etwa nur die Austrittstemperatur und die Durchflußzeit, so kann für jede Keimart, deren Resistenz durch den Wert k bekannt ist, der Erhitzungseffekt berechnet werden. Diese Ergebnisse ermöglichen es, ein Verfahren auf ein bestimmtes Ziel auszurichten.

So konnte über die Resistenzbestimmung der verschiedenen aus Milch isolierten Kleinkolonien bildenden Organismen, die sich in pasteurisierter Milch wie folgt verteilen: 67,2 % Milch-Mikrokokken, 20,8 % Streptococcus thermophilus, 10 5 %

Streptococcus bovis, für jede Art diejenige Temperatur eines Verfahrens bei sonst gleichbleibenden Bedingungen ermittelt werden, die eine 99,99%ige Abtötung der Keime zur Folge hat (Tabelle 7). Die Umrechnung von einem Verfahren in ein anderes zur Ermittlung der Temperatur, die den gleichen Effekt bewirkt, ist ohne Schwierigkeit möglich, wenn die zugrunde gelegten Daten den wirklichen Verhältnissen entsprechen.

Unter Einbeziehung der oben beschriebenen Modellvorstellung, wobei die Temperatur mit der Zeit linear ansteigt, ergab sich für die obere Grenze der Kurzzeiterhitzung, die gesetzlich auf 74°C festgelegt ist, bei der am meisten resistenten PPK-Kultur (Milch-Mikrokokken) ein Abtötungserfolg von 97,5 %, der nicht befriedigen kann. Eine Erhöhung der Erhitzungstemperatur um 2°C , von 74 auf 76°C , wie sie auch vom bakteriologischen Ausschuss der Fachgruppe für Untersuchung von Milch und Milcherzeugnissen gefordert wird (KELLERMANN 1966) erzielt bei dem gleichen Organismus einen Effekt von 99,9 %.

Die Ergebnisse der Berechnungen dieser Arbeit stimmen sehr gut überein mit den aus praktischen Testverfahren gewonnenen Ergebnissen von WAUSCHKUHN (1965).

Dies ist ein weiterer Beweis, daß die biophysikalische Analyse eine äusserst wertvolle, man kann sagen, eine unentbehrliche Ergänzung zum praktischen Testverfahren darstellt. Es ist dringend wünschenswert auch in der Milchwirtschaft sich dieser Methode zu bedienen.

VI. Zusammenfassung

Das milchwirtschaftliche Problem der Pin-Point-Kolonien wurde eingehend studiert und kann aufgrund der Ergebnisse wie folgt erklärt werden.

Von 300 im Labor pasteurisierten Rohmilchproben enthielten 34 % PPK in größerer Anzahl. Daran waren folgende Organismen beteiligt: *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians*, *Streptococcus thermophilus* und *Streptococcus bovis*.

Die Entstehung von PPK wird in erster Linie von der Nährbodenzusammensetzung bestimmt, wobei der Zuckergehalt eine entscheidende Rolle spielt.

Streptococcus thermophilus wächst ohne Zucker überhaupt nicht an. Die unterste Zuckerkonzentration liegt für ihn bei 0,003 %. Auch bei höheren Zuckerkonzentrationen neigt er zur Bildung von kleinen Kolonien (PPK).

Streptococcus bovis verhält sich ähnlich wie *Streptococcus thermophilus*, er ist aber nicht absolut zuckerbedürftig.

Die isolierten Mikrokokken zeichnen sich durch ein sehr langsames Wachstum aus, besonders bei den Tiefen-Kolonien, das bei Zuckermangel noch stärker in Erscheinung tritt; daher kommt es auch bei ihnen zur Bildung von PPK.

Die amtlich vorgeschriebene Bebrütungsdauer von 48 Stunden bei einer Temperatur von 30°C reicht nicht aus, daß die thermophilen Organismen und die langsam wachsenden Mikrokokken ihre optimale Koloniengröße erreichen- ihre Kolonien erscheinen als PPK.

Die PPK sind bei der Keimzahlbestimmung ebenso auf Platten von Rohmilchproben anzutreffen, nur treten sie gegenüber den Kolonien anderer Organismen an Zahl in den Hintergrund.

Die Pasteurisierung bedingt eine Auslese Kleinkolonien bildender hitzeresistenter Organismen. Deshalb treten sie oft in größerer Zahl bei der Keimzahlbestimmung in pasteurisierter Milch auf.

Eine mutative Beeinflussung der PPK bildenden Organismen bezüglich des Ausmaßes ihrer Koloniengröße konnte nicht festgestellt

werden. Hohe Temperaturen wirken nicht mutagen !

Ein vermindertes Größenwachstum von Kolonien erhitzter Organismen konnte beschränkt nur bei Mikrokokken beobachtet werden, die zur Bildung größerer Zellverbände neigen.

Bei einer Erhitzung wird der größte Teil der Zellen eines Verbandes abgetötet, und die wenigen weitgehend vereinzelter Überlebenden erreichen demzufolge erst später - also bei einer längeren Bebrütung - eine bestimmte Koloniengröße.

Die von PPK isolierten Organismen besitzen durchweg gegenüber den Temperaturen der amtlich zugelassenen Erhitzungsverfahren eine relativ hohe Resistenz.

Die Resistenz der einzelnen isolierten Arten konnte mit Hilfe der von JANOSCHEK entwickelten Reaktionskinetik mathematisch durch die Konstante k ausgedrückt werden.

Die isolierten Mikrokokken haben einen relativ kleinen k -Wert. Sie besitzen somit die höchste Resistenz gegenüber einwirkender Hitze.

Unter Zugrundelegung der mathematischen Berechnung des Reaktionsablaufes der Abtötung durch Hitze konnten unter Berücksichtigung der Kennzahlen eines Erhitzers für alle isolierten PPK-bildenden Organismen diejenigen Temperaturen errechnet werden, die eine 99,9 %ige Abtötung erzielen. Temperaturen von $76 - 76,5^{\circ}\text{C}$ bei der Kurzzeiterhitzung würden auch die Organismen der PPK nahezu restlos abtöten.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ABD-EL-MALEK, Y. u. GIBSON T: Journ. Dairy Res. 15, 233-248, 249-260 (1948)
- ANDERSEN, K. P. : XII. Intern. Milchwirtsch. Kongr. Stockholm, 3. Band, Sekt. IIIa, 90-97 (1949)
- AYERS, S. H. u. MUDGE, C. S. : zit. n. Reuss (1961)
- AYERS, S. H. u. JOHNSON, W. M. T: zit. n. Reuss (1961)
- BERGEY : Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl., London (1957)
- BLAU, M. u. ALTENBURGER, K. : Z. f. Physik, 12, 315 (1922)
- BOYSEN u. GODBERSEN : Molkerei- u. Käserei-Zeitung, 14, 456-459 (1955)
- BRUNCKE, R : Allgem. Milchwirtsch. u. Milchhygiene, Dtsch. Bauernverlag (1952)
- CHARLTON, D. B. : Journ. Dairy Sci. 15, 393-399 (1932)
- CHARM, S. E. : Food Technology (Januar 1958)
- CHICK, H. : Journ. of Hyg., 2, 92 (1908)
- CHRISTOPHERSEN, J. : Milchwissenschaft 6, 309-313 (1951)
- CHRISTOPHERSEN, J. u. PRECHT, H. : Biolog. Zentralbl. 71, 585 (1952)
- DEMETER, K. J. : Bakteriolog. Untersuchungsmeth. d. Milchw., Verl. Ulmer Stuttgart (1952)
- DIEHM, M. M. : Journ. of Infections Diseases 45, 61-72 (1929)
- DESSAUER, F. : Quantanbiologie, Springer-Verlag Berlin (1954)
- FAY, A. C. : Journ. of Bacteriol. 13, 347-377 (1927)
- FESSEN, K. : Die biophysikalische Analyse und die mathematische Formulierung der biologischen Wirkung der Pasteurisation speziell von Milch Dissertation Giessen (1962)
- GLOCKER, R. : Festschrift d. T. H. Stuttgart z. Vollendung ihres 1. Jahrh. (1829-1929), S. 109-118, Springer-Verlag Berlin (1929)

- GLOCKER, R. : Radiology 18, 13 (1932)
Z.f. Physik 77, 633 (1932)
- HALLMANN, L. : Bakteriologie und Serologie, 3. Aufl.
Georg Thieme-Verl. Stuttgart (1961)
- IKEDA, K. : zit. n. Paul u. Krönig
- JANOSCHEK, A. : a). Brauwissenschaft 5, 65-71 (1953)
b). Milchwissenschaft 10, 226-227 (1955)
c). Zbl. Bakt. I Orig. 164, 204-211,
212-216 (1955)
d). Arzneimittelforschung 6, 412-413
(1956)
e). Zbl. Bakt. I Orig. 170, 195-199
(1957)
f). Stat. Vierteljahresschrift Bd. X,
H. 1/2 (1957)
g). Dtsch. Molkerei-Zeitung Kempten
F. 18 (1959)
h). Molkerei-u. Käserei-Zeitung 40,
1495-1498 (1965)
- JOHNSON u. EXWORTHY : Abstracts of Bacteriology 9, 24
(1925)
- JORDAN : Milk and Food Technology 12, 87
(1949)
- KELLERMANN, R. : a). Milchwissenschaft 3, 124 (1964)
b). Milchwissenschaft 12, 737-739 (1966)
- LEMBKE, A. : a). Zbl. Bakt. II, 96 (1937)
b). Molkerei-Zeitung 2, 747 (1953)
- MADSEN, T. H., NYMAN, M. : Z.f. Hygiene 57, 388-404 (1907)
- NAGUIB, K. M. : Studies on the Bacteriology of
ice cream
Dissertation Kairo (1961)
- ORLA-JENSEN : zit. n. Löhnis, F.: Handb. d. ldw. Bakteriologie.
1. Bd. Teil II: Demeter, K. J., 2. Aufl.
Verl. Borntraeger Berlin-Zehlendorf
(1941)
- PAUL, TH. u. KRÖNIG, B. : a). Z.f. Physik u. Chemie 21, 414-450
(1896)
b). Z.f. Hygiene 25, 1-112 (1897)
- PLOCK, K. u. WÄLZHOLZ, G. : Molkerei-Zeitung 50, 1776, 1835-1836,
1861 (1936)
- RAHN, O. : Journ. gen. Physiol. 13, 179 (1929)
- REICHENBACH, H. u.
SCHÖN, M. : Z.f. Hygiene 69, 171-222 (1911)

- REUSS, E. : Das Milchbakteriologische Problem der "Pin-Point-Kolonien" Diplomarbeit Giessen (1961)
- ROBERTSON, A.H. : zit.n.Reuss (1961)
- SCHULZ, K. : Die Reaktionskinetik des Hitzetodes im Hinblick auf die Pasteurisierung von Milch Dissertation Giessen (1957)
- SCHULZ, M.E. : Molkerei-Lexikon, Milchwirtschaft v.A-Z, Volkswirtschaftl.Verl. Kempten (1965)
- SEELMANN, M. : Biologie der Streptokokken, 2.Aufl. Verl.Hans Carl, Nürnberg (1954)
- SHARPE, M.E. : zit.n.Reuss (1961)
- STOCKER : Deutsche Molkerei-Zeitung 46, 1493-1496 (1958)
- SWENARTON, C.J. : zit.n.Reuss (1961)
- TIMOFEEFF-RESOVSKY, N.W. u. ZIMMER, K.G. : Das Trefferprinzip in der Biologie Biophysik Bd.1, Hirzel-Verl.Leipzig (1947)
- VOERKELIUS, G.A. : Dissertation T.H.München (1954)
- WÄLZHOLZ, G. : a).Milchwissenschaft 13, 541, (1958)
b).zit.n.Fessen (1962)
- WAUSCHKUHN, B.u. LIMMER, H.D. : Molkerei-u.Käserei-Zeitung 40, 1499-1506 (1965)
- WEINFURTNER, F. u. JANOSCHEK, A. : Brauwissenschaft 5, 65-71 (1953)
- ZIRKLE, R.E.u.TOBIAS, C.A. : Arch.of Bioch.and Biophys. 47, 282-306 (1953)

Wissenschaftlicher Jahresbericht der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft

München-Weihenstephan 5, 62 (1962)

Für die Überlassung des Themas und die mir
erteilte Förderung möchte ich Herrn Professor
Dr.A.Janoschek herzlich danken.

Lebenslauf

- 9.8.1935 geboren in Zabeltitz/ Sa. als Sohn des Landwirtes Dr. Walter Lieber und seiner Ehefrau Maria.
- 1941 - 1945 Besuch der Volksschule in Zabeltitz.
- 1945 Enteignung des elterlichen Betriebes
- 1945 - 1949 Besuch der Volksschule in Freiberg/Sa.
- 1949 - 1954 Besuch des naturwissenschaftlichen Zweiges der Oberschule in Freiberg/Sa.- Abitur.
- 1954 - 1955 Absolvierung eines Ergänzungskurses zur Anerkennung des Reifezeugnisses der Ostzone in Berlin-West.
- 1955 - 1957 Landwirtschaftslehre bei den Landwirten Zorn in Berlin-Spandau und Mahrt-Thomsen in Damendorf/Holstein.
- 1958 6 monatige Tätigkeit als Melker auf dem Gutsbetrieb Rosenkrantz in Schinkel/Holstein.
- 1958 - 1959 Maschinenführer bei der Maschinengemeinschaft Moers-Hülsonk /Ndrh.
- 1959 - 1963 Studium der Landwirtschaft an der Justus Liebig-Universität in Giessen.-Diplomexamen.
- 1963 5 Monate wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
- seit:
1. 11. 1963 Doktorand an der Milchwirtschaftlichen Abteilung des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus Liebig-Universität Giessen
- ab März 1965 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.
- seit 1962 verheiratet- 3 Kinder.

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546